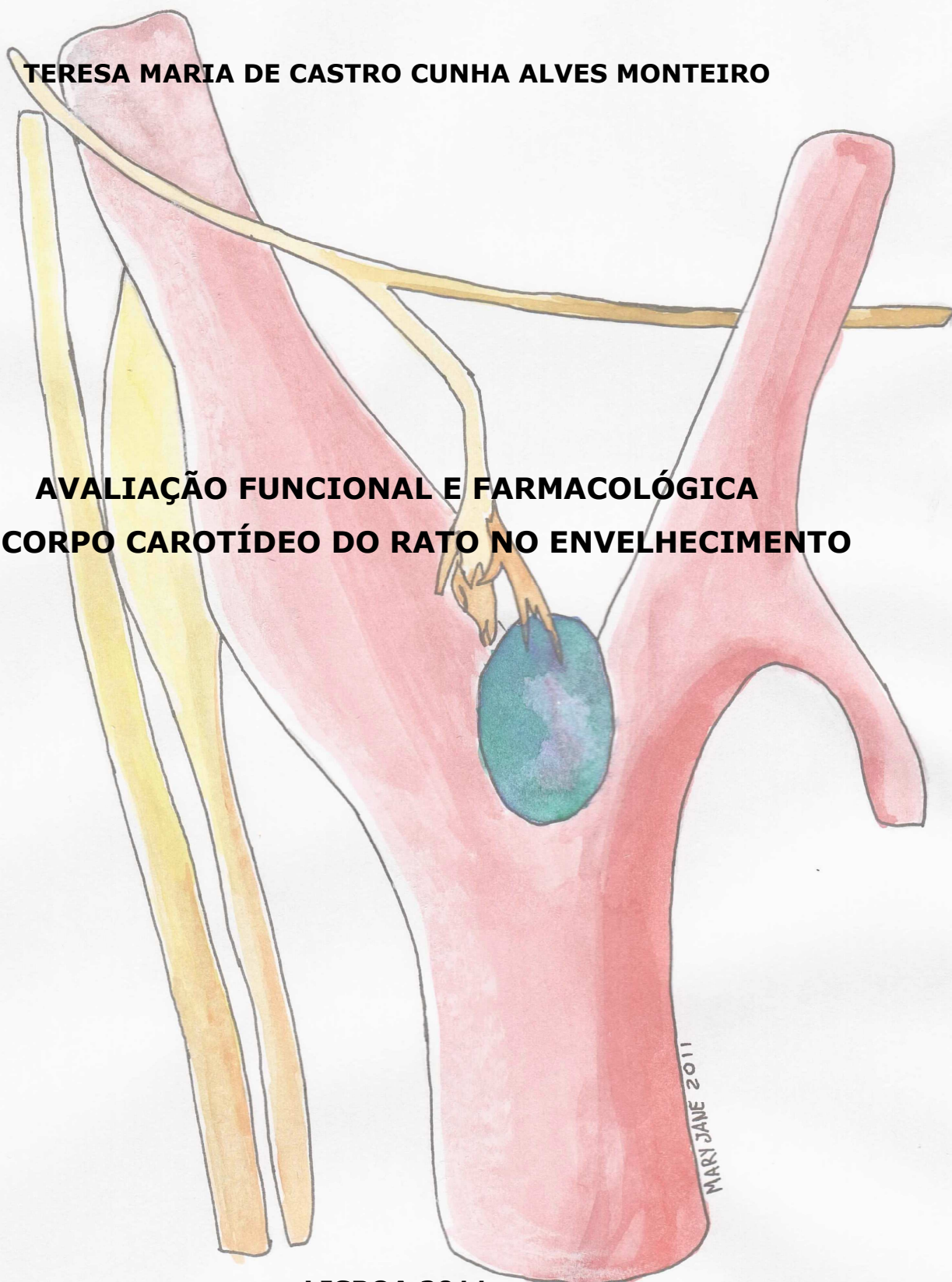




FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS | UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

TERESA MARIA DE CASTRO CUNHA ALVES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E FARMACOLÓGICA
DO CORPO CAROTÍDEO DO RATO NO ENVELHECIMENTO**



LISBOA 2011

TERESA MARIA DE CASTRO CUNHA ALVES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E FARMACOLÓGICA
DO CORPO CAROTÍDEO DO RATO NO ENVELHECIMENTO**

LISBOA 2011

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E FARMACOLÓGICA
DO CORPO CAROTÍDEO DO RATO NO ENVELHECIMENTO**

TERESA MARIA DE CASTRO CUNHA ALVES MONTEIRO

Dissertação submetida à Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Doutor em Medicina, especialidade de Farmacologia e Terapêutica.

Trabalho efectuado no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, sob orientação da Prof.^a Doutora Maria Emília Monteiro e que integra a Unidade de I&D, Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC)

LISBOA 2011

Para meus Pais, Luís, Luís
Afonso, Zum, José Vicente e
Joaninha

AGRADECIMENTOS

Gostaria de exprimir o meu verdadeiro reconhecimento e sincera gratidão à Prof.^a Doutora Maria Emília Carreira Monteiro pela sua orientação de marcada dedicação científica, confiança e encorajamento contínuo através dos anos. Não fora o seu apoio e incentivo, provavelmente nunca teria encontrado a motivação necessária para levar por diante os trabalhos desta dissertação. Sendo um exemplo profissional e pessoal, tem sido um privilégio trabalhar com uma pessoa como a minha orientadora. O seu apoio e amizade serão sempre lembrados.

Também a minha profunda gratidão ao Professor Doutor António Rendas pela confiança que depositou em mim ao permitir a aquisição dos dispositivos fundamentais à realização das experiências *in vivo* desta dissertação.

Agradeço à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, que foi o berço da minha formação médica e académica, pela gestão dos assuntos de financiamento e administrativos, bem como pela disponibilização das instalações e dos laboratórios. Para além da contribuição da Faculdade de Ciências Médicas, o trabalho experimental só foi possível graças ao Financiamento Plurianual da Unidade de I&D CEPR/CEDOC da Fundação para a Ciências e Tecnologia: fica o meu reconhecimento.

À Dra. Joana Batuca pela magnífica colaboração em toda a metodologia referente aos estudos *in vitro*.

À Dra. Eunice Matos pela assistência no laboratório com toda a amizade, dedicação e rigor científico, e que muito facilitou o meu caminho.

Também estou grata ao Prof. Doutor Constancio González Martínez pelos conselhos prático e úteis discussões.

À Dra. Rita Nunes pela oportunidade de enriquecer o meu trabalho com a sua pesquisa de excelência, demonstrando sempre um interesse e uma dedicação que nunca esquecerei.

Aos meus amigos José Gregório (*in memoriam*), Basílio Pires, Fernando Domingos e Inês Gomes pela confiança, paciência, amizade, ensinamentos e inestimável auxílio, em todas as etapas da confecção deste trabalho, quero expressar a minha profunda gratidão.

Um muito sentido agradecimento às colaboradoras do Biotério por terem cuidado dos animais usados nestas experiências com tanto zelo e dedicação, pelo excelente trabalho e pela pronta ajuda.

Agradeço a todos os meus colegas do Departamento de Farmacologia, bem como a todos os amigos da Faculdade de Ciências Médicas: obrigada pelo alegre convívio e pelas maravilhosas conversas sobre a vida e a ciência.

À Doutora Patrícia Rosado Pinto, Directora dos Estudos Pós-graduados, pela gentileza e assistência sempre que solicitada.

À Sociedade Portuguesa de Farmacologia e à International Society for Arterial Chemoreception pela oportunidade em apresentar o meu trabalho durante as suas reuniões. Também estou muito grata à revista *Age* por publicar o meu trabalho; apreciei o interesse e os comentários construtivos dos *referees* e editores.

Estou grata a todos os meus familiares e amigos pelo incentivo recebido ao longo destes anos, e que revelaram sempre muita preocupação comigo.

Ao Dr. Vítor Pereira que me trouxe de novo o futuro, o maior agradecimento com toda a estima.

Ao meu querido amigo Albertino Gaspar por me ter ensinado o compromisso com a verdade na formação médica, por todos os anos em que uma amizade foi construída, pelo exemplo de vida: inesquecível...

À minha querida amiga Maria da Conceição de Almeida e Sousa pela valiosa amizade e muita diversão, que sempre me apoiou e fez sentir tão especial, tornando-se também responsável pela conclusão deste trabalho.

Quero exprimir um agradecimento sincero a meus Pais, Marido e Filhos por mais do que aquilo que alguma vez poderei retribuir. A sua paciência infinita e o seu encorajamento significaram muito para mim. Não há palavras para exprimir a sorte que é pertencer a esta família.

“Que inquietação do fundo nos soergue?
O desejar poder querer.”

Fernando Pessoa
Mensagem

RESUMO

O corpo carotídeo gera o quimiorreflexo à hipoxia, tendo por objectivo principal a homeostase dos gases do sangue. Esta tese testou a hipótese da função destes quimiossensores não se deteriorar ao longo da idade.

In vivo, em ratos anestesiados, foram estudados os efeitos da idade nas respostas cardiorespiratórias a dois tipos de estímulos diferentes: a isquemia carotídea e a manipulação farmacológica de dois neurotransmissores com efeitos opostos nos quimiorreceptores, a adenosina e a dopamina. O modelo de isquemia carotídea corresponde à oclusão bilateral da artéria carótida comum, durante períodos de 5 a 15 s, o que determina um efeito excitatório na ventilação que é abolido pela secção bilateral dos nervos do seio carotídeo. No estudo farmacológico foram analisadas as respostas cardio-respiratórias à adenosina e à dopamina exógenas na presença e na ausência de antagonistas selectivos para os receptores A_{2A} e D_2 , respectivamente.

In vitro, no corpo carotídeo, foi quantificado o efeito de diferentes concentrações de oxigénio no conteúdo do segundo mensageiro comum à activação dos receptores A_{2A} e D_2 , o cAMP.

Em conjunto, estes resultados demonstraram que no rato o controlo da ventilação pelo corpo carotídeo se mantém inalterado ao longo da idade.

ABSTRACT

The carotid body initiates reflexes aimed principally at the homeostatic maintenance of blood gas tensions. This thesis tested the hypothesis of the function of these quimiosensores not deteriorate through age.

In vivo, in anesthetized rats, we studied the effects of age on cardiorespiratory responses to two different types of stimuli: carotid ischemia and pharmacological manipulation of neurotransmitters with two opposite effects on chemoreceptors, adenosine and dopamine. The model of carotid ischemia corresponded to bilateral occlusion of common carotid artery, during periods of 5 to 15 s, which determines an excitatory effect on ventilation that is abolished by bilateral section of carotid sinus nerve. The pharmacological study analyzed the cardiorespiratory responses to exogenous adenosine and dopamine in the presence and absence of selective antagonists for the A_{2A} and D_2 receptors, respectively. *In vitro*, at the carotid body, it was quantified the effect of different concentrations of oxygen in the content of the common second messenger for the activation of A_{2A} and D_2 receptors, the cAMP.

Together, these results showed that in rats the control of ventilation by carotid body remains unchanged through age.

ÍNDICE

1	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1	Panorâmica	1
1.2	Conceito de homeostase.....	2
1.2.1	História	2
1.2.2	Homeostase nos mamíferos	3
1.3	Regulação da ventilação.....	4
1.3.1	Receptores respiratórios.....	5
1.3.2	Controlo da ventilação	8
1.3.3	Efectores ventilatórios.....	12
1.4	Quimiorrecepção ventilatória	14
1.4.1	Quimiorreceptores centrais	14
1.4.2	Quimiorreceptores periféricos	16
1.5	O corpo carotídeo	20
1.5.1	História do corpo carotídeo	21
1.5.2	Organização estrutural do corpo carotídeo	23
1.5.3	Os estímulos do corpo carotídeo	27
1.5.4	Quimiotransdução no corpo carotídeo	33
1.5.5	Neurotransmissores e neuromoduladores no corpo carotídeo	43
1.5.6	Interações dos quimioestímulos: O corpo carotídeo como um quimiorreceptor polimodal.....	49
1.6	Envelhecimento	50
1.6.1	Introdução	50
1.6.2	O que realmente se deteriora com a idade?	54
1.6.3	Homeostase do cálcio durante o envelhecimento	56
1.6.4	Teoria mitocondrial do envelhecimento	58
1.6.5	Função dopaminérgica e purinérgica	60
1.6.6	Farmacologia e envelhecimento	62
1.6.7	Sistema respiratório e a idade.....	63
2	OBJECTIVOS	72
3	MÉTODOS.....	74
3.1	Material e métodos.....	74
3.1.1	Animais.....	74
3.1.2	Procedimentos cirúrgicos.....	74
3.1.3	Registo dos parâmetros ventilatórios	77
3.1.4	Calibração do pneumotacógrafo	78
3.1.5	Dados e análise estatística.....	79
4	EFEITO DA IDADE NOS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS E CARDIOVASCULARES BASAIS	82
4.1	Introdução	82
4.2	Material e métodos.....	83
4.3	Resultados	83
4.4	Discussão	87
5	EFEITO DA IDADE NAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA CAROTÍDEA	92
5.1	Introdução	92
5.2	Material e métodos.....	95

5.3 Resultados	97
5.3.1 Efeito da idade nas respostas ventilatórias induzidas pelas OCCs.....	97
5.3.2 Efeito da idade nas respostas cardiovasculares induzidas pelas OCCs.....	98
5.4 Discussão	100
6 EFEITO DA IDADE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À DOPAMINA MEDIADA PELO CORPO CAROTÍDEO	103
6.1 Introdução	103
6.2 Material e métodos.....	105
6.3 Resultados	107
6.3.1 Efeito dos bolus de dopamina na ventilação ao longo da idade	107
6.3.2 Efeito dos bolus de dopamina nas variáveis cardiovasculares ao longo da idade ..	109
6.3.3 Efeitos na ventilação dos bolus de dopamina na presença de domperidona ao longo da idade	109
6.3.4 Efeitos cardiovasculares da dopamina na presença de domperidona.....	110
6.3.5 Efeitos cardioventilatórios da domperidona	111
6.4 Discussão	112
7 EFEITO DA IDADE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA À ADENOSINA MEDIADA PELO CORPO CAROTÍDEO.....	117
7.1 Introdução	117
7.2 Material e métodos.....	119
7.3 Resultados	121
7.3.1 Efeitos cardioventilatórios da adenosina ao longo da idade	121
7.3.2 Efeito da adenosina na ventilação na presença de um antagonista dos receptores A _{2A} de adenosina (SCH 58261).....	124
7.3.3 Efeitos cardiovasculares da adenosina na presença de SCH 58261 ao longo da idade	125
7.3.4 Efeitos cardioventilatórios do SCH 58261	126
7.4 Discussão	128
8 EFEITO DA IDADE NA CONCENTRAÇÃO DE CAMP NO CORPO CAROTÍDEO EM RESPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÉNIO	132
8.1 Introdução	132
8.2 Material e métodos.....	134
8.2.1 Animais e preparação cirúrgica	134
8.2.2 Incubação dos corpos carotídeos para estudo do efeito da variação da % de O ₂ no conteúdo de cAMP.....	134
8.2.3 Extracção do cAMP das amostras.....	135
8.2.4 Quantificação de cAMP por EIA.....	135
8.3 Resultados	138
8.3.1 Efeitos da idade nos níveis de cAMP no corpo carotídeo em resposta a diferentes concentrações de oxigénio.....	138
8.4 Discussão	140
9 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	143
9.1 Resumo dos resultados	143
9.2 Limitações do estudo.....	146
9.3 Interpretação dos resultados	148
9.3.1 Corpo carotídeo.....	150
9.3.2 Sistema adrenérgico	154
9.3.3 Sistema purinérgico.....	156

9.4 Aplicação e perspectivas futuras	161
---	------------

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.3.	Secção dos nervos do seio carotídeo	75
Figura 3.2.	Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios	77
Figura 3.3.	Calibração do pneumotacógrafo	79
Figura 4.1.	Efeito da idade na evolução do peso corporal	83
Figura 4.2.	Efeito da idade na evolução do peso dos corpos carotídeos	84
Figura 4.3.	Efeito da idade nos parâmetros respiratórios e cardiovasculares basais	85
Figura 5.1.	Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios	96
Figura 5.2.	Alterações na ventilação durante as OCCs em ratos jovens e idosos	85
Figura 5.3.	Efeito das OCCs nos parâmetros ventilatórios ao longo da idade.....	98
Figura 5.4.	Efeito das OCCs nos parâmetros cardiovasculares ao longo da idade.....	98
Figura 5.5.	Teste da secção dos nervos do seio carotídeo	99
Figura 6.1.	Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios	106
Figura 6.2.	Comparação dos efeitos da dopamina na ventilação e na PA num animal jovem e num idoso	107
Figura 6.3.	Efeito da idade nas respostas ventilatórias à administração de dopamina	108
Figura 6.4.	Teste da secção dos nervos do seio carotídeo	108
Figura 6.5.	Comparação entre os efeitos cardiovasculares da dopamina em ratos jovens e idosos	109
Figura 6.6.	Efeito do antagonismo dos receptores D ₂ nas respostas ventilatórias à dopamina em animais jovens e idosos	110
Figura 6.7.	Efeito do antagonismo dos receptores D ₂ nas respostas cardiovasculares à dopamina em animais jovens e idosos	110
Figura 6.8.	Efeito da infusão de domperidona nos parâmetros cardioventilatórios de ratos jovens e envelhecidos	111
Figura 7.1.	Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios	120
Figura 7.2.	Exemplos de traçados originais ilustrando a resposta ventilatória aos bolus de adenosina.....	121
Figura 7.3.	Comparação entre os efeitos da adenosina à ventilação em animais jovens e idosos.....	122
Figura 7.4.	Teste da secção dos nervos do seio carotídeo	123
Figura 7.5.	Efeito da administração de adenosina nos parâmetros cardiovasculares de ratos idosos.....	124
Figura 7.6.	Efeito do SCH 58261 nas respostas ventilatórias à adenosina em ratos jovens e idosos	125
Figura 7.7.	Efeito do SCH 58261 nas respostas cardiovasculares à adenosina em ratos jovens e idosos	126
Figura 7.8.	Efeito da infusão de SCH 58261 nos parâmetros cardioventilatórios de ratos jovens e idosos	127
Figura 8.1	Princípio do imunoensaio enzimático utilizado no presente trabalho experimental	137
Figura 8.2.	Efeito da idade nos níveis de cAMP	138
Figura 8.3.	Efeito da idade nos níveis de cAMP no corpo carotídeo em resposta a diferentes concentrações de oxigénio.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Anidrase carbónica	I.P.	Intraperitoneal
ACh	Acetilcolina	I.V.	Intravenosa
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato	L-NAME	Éster da L-nitro-arginina-metil
ATP	Adenosina trifosfato	NA	Noradrenalina
BK _{Ca}	canais de K ⁺ -dependentes de Ca ²⁺	NGF	Factor de crescimento do nervo
[Ca ²⁺]	Concentração de cálcio	NSC	Nervo do seio carotídeo
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular	NMDA	N-metil-D-aspartato
cAMP	Adenosina 3',5'- monofosfato cíclico	NO	Óxido nítrico
CaO ₂	Conteúdo arterial em O ₂	NOS	Sintetase do óxido nítrico
CBs	Corpos carotídeos	NOS-1	Sintetase do óxido nítrico tipo I
CCMSRs	Células cromafins da medula supra-renal	NOS-3	Sintetase do óxido nítrico tipo III
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica	NTS	<i>nucleus tractus solitarius</i>
CMLAP	Células do músculo liso das artérias pulmonares	PA	Pressão arterial
CNE	Corpos neuroepiteliais intrapulmonares	PAM	Pressão arterial média
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PaO ₂	Pressão parcial do O ₂ do sangue arterial
DVH	Declínio ventilatório à hipoxia	PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
EMV	Esperança média de vida	Pi	Fosfato inorgânico
ETC	Cadeia transportadora de electrões	PO ₂	Pressão parcial de oxigénio
FC	Frequência cardíaca	PARPs	Poli(ADP- ribose) polimerases
GABA	Ácido δ-aminobutírico	PulmFI	fluxo aéreo pulmonar
GCS	Gânglio cervical superior	PVM	Potencial de vida máxima
GDNF	Factor neurotrófico derivado das células da glia	ROS	Espécies reactivas de oxigénio
GRMV	Grupo respiratório medular ventral	SNC	Sistema Nervoso Central
HO	Heme-oxigenase	TSC	Troca Na ⁺ /Ca ²⁺
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio	TH	Tirosina-hidroxilase
KO ₂	canais de K ⁺ sensíveis ao O ₂	TTX	Tetrodoxina
		VACHT	Transportador vesicular de ACh
		VPH	Vasoconstrição pulmonar hipóxica

I CAPÍTULO

INTRODUÇÃO GERAL

1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 PANORÂMICA

A ventilação representa um sistema homeostático: é um comportamento complexo, e pode manifestar uma variedade de padrões, dependendo das diferentes circunstâncias em que o organismo se encontra. O meio sanguíneo interno encontra o meio aéreo externo nos alvéolos pulmonares para uma rápida troca de gases, cumprindo assim o propósito primário do processo ventilatório, ou seja adquirir oxigénio e eliminar dióxido de carbono. Quaisquer alterações, quer do meio interno quer do externo desencadeiam reflexos com o propósito de ajustar a ventilação pulmonar às necessidades metabólicas do organismo. A ventilação pulmonar depende dos movimentos periódicos dos músculos respiratórios diafragma e intercostais, os quais alteram as pressões pleurais. Estes músculos são inervados pelos neurónios motores da espinal-medula, os nervos frénicos e intercostais, os quais são activados pelo centro respiratório localizado no tronco cerebral. O centro respiratório é responsável pela geração do ritmo respiratório subjacente, decidindo a frequência, profundidade e ritmo da ventilação. A actividade do centro respiratório é ajustada continuamente pelas informações de receptores centrais e periféricos. Adicionalmente, esta actividade está bem coordenada com outros movimentos que possam alterar o fluxo ventilatório como a fala e os reflexos das vias respiratórias – a tosse ou o espirro –, tendo de se integrar com o controlo voluntário ou autonómico de estruturas nervosas superiores, incluindo o córtex cerebral e o hipotálamo. O sistema homeostático respiratório possui também plasticidade, e consegue adaptar-se a situações fisiológicas e/ou patológicas de longa duração como o exercício, a altitude, a gravidez, a alteração do peso ou durante as doenças pulmonares.

Esta dissertação é dedicada ao estudo de um dos órgãos mais importantes do sistema homeostático respiratório: o corpo carotídeo. Este órgão, caracteristicamente conhecido como sensor de hipoxia, é sensível a um grande espectro de variáveis sanguíneas como hipercapnia, acidose, hiperosmolaridade, hipoglicemia, hipercaliemia e alteração da temperatura. A resposta ventilatória à hipoxia e a outros estímulos naturais tem sido exaustivamente estudada nos adultos jovens. Contudo e comparativamente, tem sido dada pouca atenção às

respostas ventilatórias mediadas pelo corpo carotídeo à hipoxia, isquemia e fármacos no envelhecimento. Esta tese investigou a função do corpo carotídeo na homeostase respiratória ao longo da idade, sabendo que a idade está ligada precisamente a uma diminuição da capacidade de manter a homeostase do organismo. Utilizando um modelo *in vitro*, e dado o papel preponderante da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) como uma via comum de diversos mecanismos envolvidos na resposta do corpo carotídeo à hipoxia, foi testada a hipótese da idade diminuir a capacidade deste órgão para alterar o nível deste nucleótido cíclico em resposta às variações de O₂. Num modelo animal *in vivo* utilizando ratos anestesiados e respirando espontaneamente, foram estudadas as respostas ventilatórias mediadas pelo corpo carotídeo a estímulos conhecidos, quer excitatórios (isquemia e adenosina), quer inibitórios (dopamina) ao longo da idade. Este capítulo inicial inclui revisões introdutórias nos seguintes assuntos: Conceito de homeostase, regulação da ventilação, quimiossensores respiratórios centrais e periféricos, o corpo carotídeo e a resposta ventilatória no envelhecimento.

1.2 CONCEITO DE HOMEOSTASE

A homeostase é o controlo de um parâmetro vital, e nunca um conceito foi mais central no desenvolvimento de um pensamento fisiológico do que o princípio da homeostase (Moore-Ede, 1986; Berne, 2004). Este conceito foi introduzido no século XIX e as suas aplicações ao longo dos anos impulsionaram, em grande extensão, o conhecimento de vários órgãos e, conseqüentemente, dos mecanismos fisiopatológicos das doenças.

1.2.1 História

A ideia inicial de homeostase foi pela primeira vez proferida em 1860 por um dos maiores médicos fisiologistas do século XIX, o Francês Claude Bernard: ele escreveu, "*La fixité du milieu intérieur est la condition d'une vie libre et indépendante*", tornando-se a base de uma lei da matéria viva por si criada, afirmando que o óptimo funcionamento de um organismo exige que as células estejam rodeadas de um meio de composição fixa (Noble, 2008). A lei de Bernard respeitando à constância do meio biológico interior foi consagrada com o termo "*homeostasis*" nos anos 20 do século XX pelo fisiologista Americano Walter

Cannon (Schulkin, 2003). Cannon enfatizou que o termo homeostase não pressupõe algo fixo e rígido, uma estagnação, mas significa uma condição que pode variar, apesar de se manter relativamente constante, daí ter sido escolhido o prefixo "homeo" e não "homo" (Moore-Ede, 1986).

Um conceito fundamental vindo da cibernética, ciência interdisciplinar que usa modelos matemáticos aplicados a teorias para definir o comportamento de um sistema de controlo complexo, é o de retrocontrolo ou *feedback*. O retrocontrolo é o fenómeno no qual a consequência do funcionamento de um sistema é enviado para esse mesmo sistema, influenciando em parte o seu posterior desempenho. Neste desenho de controlo há uma medição contínua da diferença entre os níveis atingidos e os desejáveis (sinal de erro) e, se necessária, a consequente implementação de uma modificação. Mais do que um circuito único de retrocontrolo podendo actuar de modo sinérgico ou antagónico, num determinado contexto fisiológico deve ser considerada uma hierarquia entre os vários circuitos de retrocontrolo (Berne, 2004).

Outro controlo de sistemas fundamental é o sistema de precontrolo ou *feedforward* no qual nenhuma informação do sistema que está a ser controlado é usada para ajustar a actividade desse mesmo sistema. Este conceito foi desenvolvido pelo neurofisiologista americano Warren McCulloch e pelo especialista em lógica Walter Pitts em 1943 como a teoria que está na base do desenvolvimento das redes neuronais (Lytton, 1998).

1.2.2 Homeostase nos mamíferos

Os mecanismos de controlo fisiológico nos mamíferos têm sido submetidos a uma análise experimental detalhada. Diversas variáveis fisiológicas nos mamíferos, como a temperatura corporal, o pH sanguíneo ou a concentração de glicose, estão sujeitas a alterações devidas tanto ao meio externo como interno, e é da responsabilidade do sistema homeostático trazê-las de volta aos seus correspondentes limites normais. A regulação homeostática relativa a qualquer variável fisiológica particular requer uma monitorização das suas alterações (sensores), um meio para interpretar e integrar a informação dos sensores com vista a produzir uma resposta correctiva apropriada (controladores) e, finalmente, mecanismos que conduzam a variável ao nível desejado (efectores). Muitas regiões do sistema nervoso central (SNC) são sensíveis a alterações

específicas da composição do sangue (sensores centrais). Outros órgãos sensores estão localizados fora do SNC, e transmitem-lhe a sua informação via nervos sensitivos (sensores periféricos). A componente de interpretação e integração do processo homeostático reside quase exclusivamente a nível do SNC. Os sinais fornecidos pelo SNC são conduzidos aos órgãos efectores quer por vias nervosas (incluindo nervos somáticos inervando os elementos contrácteis dos músculos esqueléticos e nervos autonómicos inervando todos os outros tecidos efectores, isto é o músculo liso, o músculo cardíaco, as glândulas exócrinas e certas glândulas endócrinas, ou seja as supra-renais), quer por vias humorais, onde hormonas circulantes são os principais mensageiros para os tecidos efectores. Para além da sua interpretação dos impulsos sensitivos, o SNC também realiza tarefas predictivas, podendo a homeostase ser classificada como predictiva ou reactiva. A homeostase predictiva pode ser duma importância primordial em muitas situações, dado que permite uma utilização imediata de mecanismos fisiológicos e pode, por definição, ocorrer antes da modificação necessária na variável a controlar (Moore-Ede, 1986).

1.3 REGULAÇÃO DA VENTILAÇÃO

A regulação do sistema respiratório tem como objectivo manter os valores de pressão parcial de oxigénio (PO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) e pH arteriais dentro de limites muito estreitos. Alcançar este fim envolve diversas contribuições, incluindo: receptores respiratórios (são sensíveis a variáveis que devem ser controladas, traduzindo e transmitindo sinais para um local apropriado do SNC); controladores respiratórios (presentes no SNC, coordenando os sinais e consequentemente controlando a actividade dos motoneurónios que actuam nos efectores); e os efectores respiratórios (basicamente, os músculos actuando de acordo com os sinais do motoneurónio eferente, causando a ventilação pulmonar). Estes componentes trabalham de uma forma integrada de modo a manter um ritmo respiratório regular e uma mecânica ventilatória e, assim, uma ventilação pulmonar apropriada a um normal equilíbrio ácido-base sanguíneo.

1.3.1 Receptores respiratórios

1.3.1.1 Quimiorreceptores

Os quimiorreceptores são sensores que conseguem testar a composição química do sangue ou doutro meio que os rodeie como por exemplo o fluido do meio envolvente dos neurónios. Os quimiorreceptores respiratórios estão localizados tanto periféricamente como centralmente. Os quimiorreceptores periféricos funcionalmente mais importantes são os corpos carotídeos, os quais aumentam a sua actividade em resposta à hipoxia, hipercapnia e acidose, bem como a um conjunto de outros factores humorais. Os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no tronco cerebral e cérebro. Respondem à hipercapnia, provavelmente devido ao efeito desta na diminuição do pH do líquido (Berne, 2004). Duas das secções subsequentes (1.4 e 1.5) serão dedicadas aos quimiorreceptores respiratórios e ao corpo carotídeo.

1.3.1.2 Receptores pulmonares e da árvore traqueobrônquica

Vários impulsos sensitivos tendo origem no pulmão e na árvore traqueobrônquica funcionam como reflexos de regulação e de defesa (Berne, 2004; Hanacek *et al.*, 2006; Tatar *et al.*, 2008). Estes receptores incluem:

1.3.1.2.1 Receptores pulmonares de estiramento de adaptação lenta

Estes aferentes encontram-se no músculo liso, e os seus sinais são conduzidos pelas fibras mielinizadas largas do vago: indicam ao cérebro o volume pulmonar; a sua frequência de descarga permanece durante um estímulo mantido, como a insuflação pulmonar, uma vez que são lentamente adaptáveis (Hanacek *et al.*, 2006; Tatar *et al.*, 2008). Provocam um desligar inspiratório e são responsáveis pelo reflexo da insuflação de Hering-Breuer, provocando uma diminuição da frequência respiratória por aumento da pausa expiratória, e dilatação das vias aéreas por relaxamento do músculo liso traqueobrônquico (Tsubone, 1986; Widdicombe, 1992).

1.3.1.2.2 Receptores pulmonares de adaptação rápida

Estes receptores, também conhecidos como irritativos ou de deflação, encontram-se entre as células epiteliais, e podem ser estimulados por gases tóxicos, fumo, pó inalado e ar frio, e estão envolvidos em funções atribuíveis a

mecanorreceptores, respondendo a reduções na *compliance* pulmonar. Os seus impulsos são transmitidos por fibras mielinizadas via nervo vago. Estes receptores demonstram uma rápida adaptação, dando início a um reflexo que conduz a hiperventilação e broncoconstrição. São estimulados pela congestão pulmonar, microembolia, atelectasia e pneumotórax, e a sua activação pela histamina desempenha um papel nos acessos asmáticos (Tsubone, 1986;Widdicombe, 1992).

1.3.1.2.3 *Terminações nociceptivas alveolares (receptores J)*

Estes receptores justa-capilares ou receptores *J* encontram-se nas paredes alveolares, junto aos capilares, e são activados pelo aumento de volume do fluido intersticial da parede alveolar. Os seus impulsos são transmitidos via fibras-C não mielinizadas de condução lenta, as quais formam a maior parte das fibras aferentes do nervo vago pulmonar. O reflexo iniciado pela sua activação resulta numa ventilação rápida e superficial, e uma estimulação intensa pode resultar em apneia (Anand & Paintal, 1980;Paintal & Anand, 1992;Anand *et al.*, 1993). Podem de facto estar envolvidos na respiração rápida e superficial, bem como na dispneia associada à insuficiência cardíaca esquerda e doença pulmonar intersticial. A sensação desagradável de pressão e tosse seca que acompanham a dispneia durante o edema pulmonar das altitudes elevadas ou após exercício forçado ao nível médio das águas do mar são induzidos por receptores *J* (Paintal, 1969;Paintal, 1995).

1.3.1.2.4 *Fibras-C brônquicas*

Algumas das fibras-C de condução lenta não mielinizadas do nervo vago acabam como terminações nervosas livres nas paredes da traqueia e dos brônquios, e tem sido sugerido estarem envolvidas no reflexo da tosse (Karlsson, 1996). Estão localizadas em áreas irrigadas pela circulação brônquica, mas também são estimuladas pela congestão venosa pulmonar (Gunawardena *et al.*, 2002). Recentemente foi sugerido que as fibras-C brônquicas também são activadas pela diminuição da *compliance* pulmonar, apesar da sua sensibilidade ser inferior àquela dos receptores pulmonares de adaptação rápida (Ma *et al.*, 2003).

1.3.1.3 Receptores das vias aéreas superiores

Estes receptores encontram-se a nível da via nasal, nasofaringe, orofaringe, laringe e porção da traqueia extra-torácica, e as suas vias aferentes são conduzidas, de acordo com a sua localização anatómica, via nervos olfactivo, trigémeo, glossofaríngeo, vago e hipoglosso. Os principais aspectos funcionais que envolvem estes receptores são defender e proteger as vias aéreas inferiores, e manter permeáveis as vias aéreas superiores (Sant'Ambrogio *et al.*, 1995; Nishino *et al.*, 2004). A activação destes receptores inicia vários reflexos, tais como espirro, tosse, aspiração, espasmo da laringe, broncoconstricção ou apneia (Widdicombe, 1998). Muitos aferentes originam-se em receptores térmicos, irritativos ou de pressão (McBride & Whitelaw, 1981; Redline & Strohl, 1987), mas alguns receptores são quimiossensores, por exemplo os receptores da laringe são sensíveis às concentrações de CO₂ no ar expirado (Bradford *et al.*, 1994; Sant'Ambrogio *et al.*, 1995).

1.3.1.4 Receptores dos músculos respiratórios e articulações costovertebrais

Os aferentes dos feixes musculares e tendões dos músculos intercostais e diafragma, juntamente com os mecanorreceptores das articulações costovertebrais, demonstraram estar envolvidos na monitorização do trabalho ventilatório, e transmitem a sensação de dispneia quando é necessário um esforço considerável para mobilizar os pulmões e a parede torácica em situações de obstrução pulmonar (Bolser *et al.*, 1987; Shannon *et al.*, 1987).

1.3.1.5 Outros receptores

1.3.1.5.1 Barorreceptores arteriais

Durante a hipertensão arterial, a estimulação dos barorreceptores aórticos e carotídeos conduz à inibição da ventilação, quer directamente diminuindo o tónus central respiratório, quer indirectamente por inibição dos quimiorreceptores periféricos (Heistad *et al.*, 1974; Maass-Moreno & Katona, 1989; Marshall, 1994). Pelo contrário, a redução da pressão arterial pode provocar hiperventilação (Ohtake & Jennings, 1992).

1.3.1.5.2 *Proprioceptores dos membros*

É bem conhecido que os estímulos mecânicos e químicos iniciados nos músculos em movimento são responsáveis pelo rápido início da hiperpneia do exercício, e pode ser proporcional à taxa metabólica (McCloskey & Mitchell, 1972; Dempsey *et al.*, 1972).

1.3.1.5.3 *Nociceptores periféricos*

A dor pode causar apneia ou hiperventilação (Berne, 2004). Está associada a um aumento dos impulsos motores respiratórios no homem, como são exemplos a indução da dor através da infusão de soro no masséter de voluntários (Kato *et al.*, 2001) ou as contracções uterinas dolorosas durante o trabalho de parto (Hagerdal *et al.*, 1983) e, em ratos, como é exemplo a aplicação tópica de mustarda nos membros (Jiang *et al.*, 2004). Contrariamente, a estimulação dolorosa do nervo trigémeo nos ratos conduz a apneia (Dutschmann & Herbert, 1996). Em investigação recente no homem, o efeito da dor na actividade respiratória utilizando a estimulação eléctrica percutânea do nervo tibial durante a inspiração é um aumento nos impulsos inspiratórios (Green *et al.*, 2008). O local de integração entre a nocicepção cutânea e a ventilação é a nível dos neurónios pontinos parabraquiais, tal como já foi demonstrado no rato (Jiang *et al.*, 2004).

1.3.1.5.4 *Termorreceptores periféricos*

Os termorreceptores periféricos podem alterar os parâmetros ventilatórios: o aquecimento da pele pode conduzir a hiperventilação (Boden *et al.*, 2000), e a resposta inicial ao arrefecimento tipo arquejo e hiperventilação incontrolável parece resultar do impulso nervoso a partir dos receptores cutâneos para o frio (Tipton *et al.*, 1998).

1.3.2 Controlo da ventilação

1.3.2.1 Características dos neurónios respiratórios

A ventilação é controlada por uma rede neuronal composta por grupos específicos de neurónios respiratórios que estão envolvidos no processamento e integração dos impulsos nervosos, na geração e na manutenção do ritmo

respiratório, e na transmissão das mensagens sinápticas aos efectores respiratórios (Millhorn *et al.*, 1981; Bianchi *et al.*, 1995b; Richter & Spyer, 2001; Feldman *et al.*, 2003a; Duffin, 2004). Os neurónios respiratórios têm sido classificados, de acordo com o seu padrão de descarga e o tempo decorrido relativamente à actividade do nervo frénico, em seis tipos: neurónios inspiratórios iniciais, inspiratórios, inspiratórios tardios, pós-inspiratórios, expiratórios e pré-inspiratórios. Estes neurónios estão dispostos numa rede neuronal que é tonicamente activa desde *in utero* e durante toda a vida. Quando os neurónios estão silenciosos, isso significa que recebem potenciais pós-sinápticos inibitórios e, quando estão activos, recebem simultaneamente impulsos pós-sinápticos excitatórios e inibitórios. Enquanto que as interconexões entre diferentes tipos de neurónios são predominantemente inibitórias, as conexões entre tipos homólogos de neurónios, particularmente entre neurónios inspiratórios, são excitatórias (Cohen, 1979; Smith *et al.*, 1990; Schwarzacher *et al.*, 1991). Os processos excitatórios sinápticos são, na sua grande maioria, mediados pelo glutamato actuando via receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Pierrefiche *et al.*, 1994; Pierrefiche *et al.*, 1998; Haji *et al.*, 2002; Harris & Milsom, 2003). Os dois principais neurotransmissores inibitórios são a glicina e o ácido δ -aminobutírico (GABA), actuando respectivamente nos receptores ionotrópicos glicinérgicos permeáveis ao cloro e nos de GABA_A (Taveira da Silva *et al.*, 1987; Haji *et al.*, 1990; Kazemi & Hoop, 1991; Busselberg *et al.*, 2001; Saywell & Feldman, 2004).

1.3.2.2 Localização dos neurónios respiratórios

Os neurónios respiratórios estão localizados preferencialmente na porção inferior do tronco cerebral, distribuindo-se em ninhos, longitudinalmente e de forma simétrica. Os neurónios do grupo respiratório da ponte estão envolvidos no controlo do tempo inspiratório e na modulação da frequência respiratória, e têm conexão com outras estruturas do cérebro como o *nucleus tractus solitarius* (NTS) e o hipotálamo (Feldman & Gautier, 1976; Saper *et al.*, 1976; Jodkowski *et al.*, 1994; Ezure *et al.*, 1998; Nattie, 1999). Na *medulla oblongata*, o NTS constitui o grupo respiratório dorsal, o qual recebe aferentes dos mecano – e quimiorreceptores, e projecta eferentes para os neurónios pré-motores e

motoneurónios da medula (Duffin & Lipski, 1987; Vardhan *et al.*, 1993; Bianchi *et al.*, 1995a; Nattie, 1999; Suzuki *et al.*, 2004). O grupo respiratório medular ventral (GRMV) consiste numa coluna longa subdividida numa porção caudal e numa porção proximal. Muitos neurónios pré-motores expiratórios encontram-se na porção caudal da GRMV, enquanto que na porção proximal predominam muitos dos neurónios pré-motores inspiratórios. A área intermédia contém tantos neurónios inspiratórios como expiratórios (Shen & Duffin, 2002; Stornetta *et al.*, 2003; Duffin, 2004). Proximalmente, o complexo Bötzinger e o grupo respiratório parafacial encontram-se na medula ventrolateral, e o complexo pré-Bötzinger tem uma localização imediatamente caudal ao complexo Bötzinger (Onimaru & Homma, 2003; Feldman *et al.*, 2003a; Duffin, 2004).

A ventilação é única, entre os processos pertencentes ao sistema nervoso autónomo, pela possibilidade de existir um controlo voluntário, e por outras estruturas cerebrais poderem afectar o padrão ventilatório. As estruturas acima dos núcleos da ponte podem modificar a actividade respiratória por actuarem directamente nos geradores de padrão respiratório da área medular da ponte, ou nos interneurónios ou motoneurónios que controlam os músculos respiratórios a um nível segmentar (Aminoff & Sears, 1971; Mancia *et al.*, 1974; Kastella *et al.*, 1974; Vibert *et al.*, 1979; Reddy *et al.*, 2005).

1.3.2.3 Ritmogénese ventilatória

Relativamente ao controlo neuronal da ventilação nos mamíferos, o preciso mecanismo da ritmogénese continua um problema central por resolver, e diversas teorias têm sido propostas. A primeira é a “*teoria da rede*” que assume que o ritmo ventilatório consiste em três fases activas e controladas: inspiratória, pós-inspiratória e expiratória. Esta teoria foi renovada sob a forma de “*teoria da rede de impulso condicionado*”, a qual defende que a alternância da actividade rítmica de cada uma das fases será originada da interacção sináptica, sobretudo inibitória, entre os neurónios respiratórios (vd 1.3.2.1), bem como do ajuste dinâmico intrínseco dos impulsos nervosos (Richter *et al.*, 1992; Richter & Spyer, 2001). A “*teoria pacemaker*” advoga que o ritmo ventilatório tem origem nas células *pacemaker*, as quais têm a propriedade intrínseca de disparo oscilatório de impulsos, sendo sugerido que o complexo pré-Bötzinger seja o foco da ritmogénese ventilatória (Smith *et al.*, 1990; Feldman *et al.*, 1991; Gray *et al.*,

1999;Gray *et al.*, 2001;Feldman *et al.*, 2003a). Contudo, a descoberta de outros neurónios com propriedades *pacemaker*, principalmente no grupo respiratório para-facial, deu origem a uma nova teoria, a “teoria do duplo gerador de ritmo” (Onimaru *et al.*, 1989;Onimaru & Homma, 2003;Janczewski & Feldman, 2006ab;Janczewski & Feldman, 2006ba). Uma “teoria eclética híbrida *pacemaker-rede*” foi descrita conciliando as duas teorias (Butera, Jr. *et al.*, 1999a;Butera, Jr. *et al.*, 1999b;Smith *et al.*, 2000;Dunin-Barkowski *et al.*, 2003).

1.3.2.4 Neuroplasticidade ventilatória

A neuroplasticidade ventilatória é diferente da modulação neuroquímica (que é transitória), e pode ser definida como uma alteração morfológica e/ou funcional persistente do sistema de controlo neuronal baseado numa experiência prévia (Getting, 1989;Marder, 1998;Mitchell & Johnson, 2003). É uma faceta crucial da homeostase, tendo por objectivo manter a regulação, quer durante situações normais como desenvolvimento, envelhecimento, gravidez, actividade física ou exposição a diferentes meios ambientes, quer durante situações patológicas como doenças ou agressões cerebrais ou cardiopulmonares (Turner *et al.*, 1997;Cheng *et al.*, 2002;Mitchell & Johnson, 2003;Carroll, 2003;Goshgarian, 2003;Feldman *et al.*, 2003b). A plasticidade respiratória pode ter tempos diferentes. A plasticidade que surge rapidamente resulta de modificações covalentes directas, tais como fosforilação de proteínas existentes, o que vai aumentar a transmissão sináptica. A plasticidade que surge em tempo intermédio necessita frequentemente da síntese de novas proteínas, principalmente via translação de mRNA existente, ou atraso na degradação das proteínas. A plasticidade que surge mais lentamente está associada à síntese de proteínas dependentes de transcrição. O comportamento respiratório vai depender de uma ou mais destas formas de plasticidade, dependendo da duração, intensidade, padrão e história da estimulação, e as mudanças plásticas podem ocorrer de forma isolada ou em múltiplos locais, em paralelo ou em sequência, através do sistema de controlo respiratório (Gray *et al.*, 1999;Ling *et al.*, 2001;Mitchell *et al.*, 2001;Prabhakar, 2001;Mitchell & Johnson, 2003;Baker-Herman *et al.*, 2004;Prabhakar & Jacono, 2005).

1.3.3 Efectores ventilatórios

Os efectores respiratórios são principalmente os músculos cujas contracções periódicas conduzem a alterações da pressão intratorácica e, eventualmente, a alteração da ventilação pulmonar. Os vários grupos de músculos respiratórios trabalham de uma forma coordenada com base nos controladores de impulsos motores, produzindo as duas fases da ventilação. Os músculos são considerados inspiratórios ou expiratórios consoante o seu tempo de activação-contracção dentro do ciclo respiratório.

1.3.3.1 O diafragma

O diafragma é o principal músculo respiratório. É innervado pelos motoneurónios do nervo frénico, os quais têm origem na espinal-medula nos níveis C3-C6 (Berger, 1979; Bianchi *et al.*, 1995b). A ventilação normal em repouso implica a contracção do diafragma e o aumento do comprimento da caixa torácica. Seguidamente, a pressão negativa intra torácica, contrapondo-se à pressão atmosférica, provoca uma expansão passiva dos pulmões. O relaxamento do diafragma encurta a caixa torácica o que, juntamente com o *recoil* elástico, conduz a uma saída de ar dos pulmões. Mais do que uma interacção aditiva, os dois hemidiafragmas têm uma interacção sinérgica nos pulmões, e a magnitude deste sinergismo é tanto maior quanto maior for a actividade ventilatória (De Troyer *et al.* 2003).

1.3.3.2 Músculos abdominais

Quando a frequência expiratória deva ser aumentada, como na ventilação profunda, entra em acção um grupo de músculos acessórios. A parede ventrolateral do abdómen inclui quatro músculos: recto abdominal, oblíquo externo, oblíquo interno e transversos abdominais. A contracção destes músculos empurra o conteúdo abdominal, o qual vai exercer pressão no diafragma, e o deslocar cefálico deste músculo vai fornecer maior força para a expiração (D'Angelo *et al.*, 2003).

1.3.3.3 Músculos intercostais

Os músculos intercostais são innervados pelo correspondente nervo intercostal, e dividem-se num grupo externo e num grupo interno. A classificação de cada

grupo como inspiratório ou expiratório tem sido controversa desde sempre, em parte devido a basear-se na vantagem mecânica da sua localização topográfica. Por exemplo, os músculos intercostais externos da porção dorsal dos espaços intercostais proximais têm um efeito mecânico inspiratório absoluto, o qual diminui gradualmente se caminharmos na direcção ventro-caudal e, consequentemente, os músculos intercostais externos da porção ventral dos espaços intercostais 6-8 têm uma vantagem mecânica expiratória (De Troyer et al., 2005). A porção intercartiláginea dos músculos intercostais (intercostais paraesternais), ao contrair-se coordenadamente com os intercostais externos, expandem os pulmões por elevarem as costelas e, consequentemente, expandirem a caixa torácica. As alterações da pressão intratorácica produzida por estes músculos respiratórios intercostais interagem sinergicamente com o diafragma até um grau que aumenta com o aumento de volume pulmonar (DiMarco et al., 1989; De Troyer et al., 2005). Por outro lado, o músculo triangular do esterno e os músculos intercostais interósseos internos têm uma nítida vantagem para a mecânica expiratória (De Troyer et al., 2005).

1.3.3.4 Músculos do pescoço

Dois músculos do pescoço em particular, nomeadamente os escalenos e os esternomastoideus, têm vantagem na mecânica inspiratória e sempre foram considerados como músculos acessórios da inspiração. De facto, os esternomastoideus contraem-se em situações de intenso esforço inspiratório e não estão activos na ventilação em repouso, mas pensa-se que os escalenos estejam sempre activos durante a inspiração em repouso em humanos sem patologia (Raper et al., 1966; Legrand et al., 2003).

1.3.3.5 Músculos das vias aéreas

O sinergismo motor da ventilação inclui não só os referidos músculos principais e acessórios, mas também os músculos que mantêm a permeabilidade das vias aéreas superiores, nomeadamente os músculos da faringe, laringe, geniglosso e das asas do nariz, bem como o músculo liso da árvore traqueobrônquica (Berne, 2004).

1.4 QUIMIORRECEPÇÃO VENTILATÓRIA

A quimiorrecepção ventilatória é vital para a adaptação da ventilação às necessidades metabólicas e para manter a homeostase da composição iónica do organismo. O controlo químico da ventilação é efectuado por um grupo de estruturas nervosas – quimiorreceptores – que actuam produzindo impulsos nervosos posteriormente conduzidos, os quais reflectem a adequação da ventilação relativamente ao metabolismo. Os quimiorreceptores sensíveis ao oxigénio são externos ao cérebro, e são denominados quimiorreceptores periféricos. Estes encontram-se principalmente nos corpos carotídeos. Os quimiorreceptores de CO_2/H^+ encontram-se também nos corpos carotídeos, mas a sua localização principal é a nível cerebral, e são chamados quimiorreceptores centrais (Nattie, 1999;Feldman *et al.*, 2003b).

1.4.1 Quimiorreceptores centrais

Antes da descoberta da natureza quimiossensora do corpo carotídeo e dos corpos aórticos, suspeitava-se que os locais de quimiossensibilidade ventilatória se encontravam nos pulmões e no cérebro. Mais tarde, o pulmão foi excluído como local crucial da quimiorrecepção, e foi demonstrado que a maior parte da sensibilidade ao H^+ e CO_2 se mantém após denervação dos quimiorreceptores periféricos (Neubauer & Sunderram, 2004;Neubauer, 2004). Desde então, tem continuado a investigação para avaliar o papel funcional da quimiorrecepção a nível do SNC, sendo objectivos principais identificar os estímulos, reconhecer os mecanismos sensores e localizar os quimiorreceptores (Lipscomb & Boyarsky, 1972;Loeschcke, 1974;Loeschcke, 1982;Bruce & Cherniack, 1987;Coates *et al.*, 1993;Nattie, 1999;Lahiri & Forster, 2003).

1.4.1.1 Natureza dos estímulos e mecanismos dos sensores

Tem vindo a ser discutido se o CO_2 e os iões H^+ actuam independentemente como estímulos respiratórios, ou se todos os efeitos são secundários às alterações do pH induzido pela inalação ou retenção de CO_2 . O facto do efeito do CO_2 na ventilação ser superior ao causado pelas alterações do pH do sangue ou do líquido que ele provoca (Lipscomb & Boyarsky, 1972;Shams, 1985), e da indução de acidose no tecido medular na presença de eucapnia sistémica aumentar a actividade do nervo frénico (Coates *et al.*, 1993;Bernard *et al.*,

1996), dá suporte à ideia de que o CO_2 e os iões H^+ são dois estímulos separados. Apesar de ser uma possibilidade muito interessante, não há evidência até à data que explique o mecanismo do CO_2 como um estímulo *per si* (Feldman *et al.*, 2003a; Putnam *et al.*, 2004).

Foi demonstrado que tanto o pH extracelular (Bayliss *et al.*, 2001) como o intracelular (Filosa *et al.*, 2002; Washburn *et al.*, 2002) são detectados pelos quimiorreceptores centrais, mas como o CO_2 passa as membranas celulares com maior facilidade que os iões H^+ , postulou-se que mais do que o pH extracelular, seria o pH intracelular o estímulo, apesar do local intracelular ser indeterminado (Bruce & Cherniack, 1987). Outra proposta seria que o influxo de iões H^+ através da membrana celular estaria associado à despolarização dos quimiorreceptores. De facto, é provável que as alterações do pH *per si* não produzam potenciais de acção, mas em vez disso desencadeiem uma série de passos intermédios envolvendo várias proteínas sensíveis ao pH, isto é *gap junctions* de baixa resistência, canais rectificadores das correntes de K^+ e bomba Na^+/K^+ (Bayliss *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2001; Wiemann & Bingmann, 2001; Washburn *et al.*, 2002) e vários neurotransmissores como a serotonina, acetilcolina (ACh), nicotina, adenosina trifosfato (ATP) e glutamato (Dev & Loeschcke, 1979; Nattie & Li, 1990; Nattie *et al.*, 1993; Thomas & Spyer, 2000; Severson *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005; Gourine *et al.*, 2005a; Gourine *et al.*, 2005b). Mais do que uma função sensora de pH pode estar operacional simultaneamente (Feldman *et al.*, 2003a). Relativamente à hipoxia, o cérebro tem reservas de oxigénio limitadas e uma capacidade limitada para utilizar os processos anaeróbios, e a maioria dos neurónios responde à hipoxia diminuindo a sua actividade, ou seja reduzindo as suas necessidades metabólicas. Contudo, alguns neurónios demonstraram ser activados pela hipoxia, sendo capazes de alterar as actividades simpáticas e respiratória, sugerindo assim a presença de sensores de hipoxia a nível central (Neubauer & Sunderram, 2004).

1.4.1.2 Localização dos quimiorreceptores centrais

Desde há muitos anos, tem sido considerado que os quimiorreceptores centrais se localizam numa área junto à superfície da medula ventrolateral (Kawai *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2001; Lahiri & Forster, 2003; Richerson *et al.*, 2005), mas mais recentemente foram sendo encontradas numerosas áreas que poderão

estar envolvidas, e actualmente acredita-se que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos. Estas áreas incluem, por exemplo, o NTS (Nattie & Li, 1990; Dean *et al.*, 1990), o núcleo retrotrapezóide (Nattie *et al.*, 1991; Mulkey *et al.*, 2004; Guyenet *et al.*, 2008), o *locus coeruleus* (Pineda & Aghajanian, 1997; Putnam *et al.*, 2004), o mesencéfalo e os núcleos centrais da *raphe* medular (Bernard *et al.*, 1996; Wang & Richerson, 1999; Wang *et al.*, 2001; Severson *et al.*, 2003; Richerson, 2004; Taylor *et al.*, 2005), e o complexo pré-Bötzing (Solomon *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 2003a).

A presença de tantas áreas quimiossensíveis, sugere que os quimiorreceptores centrais estão organizados de uma forma hierárquica, ou seja são várias áreas com diferentes limiares, sensibilidades e dependências a estímulos, permitindo um fino controlo e estabilidade da ventilação. Contudo, não se sabe como estas áreas funcionam umas em relação às outras, e quais são dominantes (Nattie, 2001; Nattie & Prabhakar, 2001; Feldman *et al.*, 2003a). Tem sido demonstrada a presença de sensores centrais de oxigénio em várias áreas do cérebro, tais como o complexo nuclear parafascicular do tálamo, o hipotálamo caudal, o complexo pré-Bötzing e os neurónios vasomotores da medula ventrolateral proximal (Sun & Reis, 1994; Horn & Waldrop, 1997; Koos *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2000a; Neubauer & Sunderram, 2004).

1.4.2 Quimiorreceptores periféricos

Os quimiorreceptores respiratórios periféricos estão situados em diversas localizações extra-cranianas, incluindo: os corpos carotídeos, os corpos aórticos, os quimiorreceptores abdominais, as células musculares lisas da artéria pulmonar (CMLAPs), os corpos neuroepiteliais intrapulmonares (CNEs) e as células cromafins da medula supra-renal (Marshall, 1994; Michelakis *et al.*, 1995; Lahiri *et al.*, 1997b; Cutz & Jackson, 1999; Fujishiro *et al.*, 2004; Nishijima *et al.*, 2004). Os quimiorreceptores carotídeos, aórticos e abdominais partilham a mesma aparência histológica e são classificados como tecido glómico (Biscoe, 1971).

1.4.2.1 Quimiorreceptores carotídeos

A próxima secção principal desta introdução (1.5) é reservada para rever *O Corpo Carotídeo*.

1.4.2.2 Quimiorreceptores aórticos

Os fisiologistas Belgas, Corneille Heymans e o seu pai Jean François Heymans demonstraram, em 1927, a presença de receptores quimicamente sensíveis no arco aórtico, mas foi o fisiologista Americano Julius Hiram Comore quem investigou, no final dos anos 30 do século passado, a anatomia circulatória e nervosa, bem como as características fisiológicas dos quimiorreceptores aórticos do cão (Neubauer, 2004). Os corpos aórticos estão localizados em grupos adjacentes à parede do arco aórtico, e recebem a sua irrigação da aorta (Housley *et al.*, 1987). Contudo, em fetos e recém-nascidos de gatos e cães, alguns quimiorreceptores aórticos são irrigados pela artéria pulmonar, sendo classificados como quimiorreceptores venosos, sendo apenas depois do nascimento que ocorre a transição para a irrigação arterial sistémica (Coleridge *et al.*, 1970; Kollmeyer & Kleinman, 1975). Os impulsos aferentes dos quimiorreceptores são conduzidos simultaneamente com os impulsos aferentes dos barorreceptores do arco aórtico, através do nervo aórtico, um ramo do nervo vago, que tem os seus corpos celulares no gânglio nodoso. Os corpos aórticos recebem uma inervação simpática muito rica do gânglio estrelado, bem como eferências parasimpáticas (Marshall, 1994). Os corpos aórticos estão presentes no gato e no cão (Coleridge *et al.*, 1970; Daly & Jones, 1998), mas tem sido demonstrado serem negligenciáveis ou ausentes no rato, coelho e ratinho (Hansen & Yates, 1975; Easton & Howe, 1983; Brophy *et al.*, 1999). De facto, foi sugerido que o nervo aórtico do rato só conteria fibras barorreceptoras, dado não serem detectados quimiorreceptores durante os registos do nervo aórtico em ratos Wistar (Sapru & Krieger, 1977), e a ausência da hiperventilação como resposta à hipoxia após secção dos nervos do seio carotídeo (Martin-Body *et al.*, 1985). Contudo, no final dos anos 90, foi provada a existência de corpos aórticos no rato (Cheng *et al.*, 1997), e o registo em fibra única do nervo aórtico demonstrou a presença de quimiorreceptores aferentes nos ratos Sprague-Dawley (Brophy *et al.*, 1999). Contudo, a sua importância funcional nos ratos permanece controversa.

1.4.2.3 Quimiorreceptores abdominais

A presença de estruturas epitelióides abdominais idênticas ao tecido glómico carotídeo foi primeiramente demonstrada em 1936 por Norbert Goormaghtigh

que acreditava terem inervação motora. Contudo, W. Henry Hollinshead revelou, alguns anos mais tarde, que eram inervados por fibras sensitivas derivadas dos gânglios das raízes dorsais dos nervos espinhais (Goormaghtigh, 1936;Hollinshead, 1946). Estes corpos abdominais estão presentes de modo preponderante no rato e no ratinho (Marshall, 1994;Howe, 1995). De facto, a quantidade de tecido glómico abdominal do rato excede a do corpo carotídeo (Andrews *et al.*, 1972), e foi demonstrado que os quimiorreceptores abdominais do rato são os principais responsáveis pelo restaurar da resposta ventilatória à hipoxia após denervação do corpo carotídeo (Martin-Body *et al.*, 1985). Os corpos abdominais estão localizados em numerosos locais, tais como rodeando a raiz do vago abdominal, nos plexos hepático e celíaco, e na parede do estômago, sendo os seus impulsos quimioaferentes conduzidos pelo vago abdominal ou pelo nervo esplâncnico. Permanece desconhecido se recebem inervação simpática e/ou parassimpática (Howe *et al.*, 1981;Marshall, 1994).

1.4.2.4 Células musculares lisas das artérias pulmonares como quimiorreceptores

Os sensores de oxigénio nas CMLAPs são essenciais para a vasoconstrição pulmonar hipóxica (VPH), a qual é um mecanismo que equilibra a perfusão e ventilação com o objectivo de otimizar a PaO_2 , sem elevar a pressão da artéria pulmonar de modo significativo em situações caracterizadas por hipoxia alveolar segmentar, como por exemplo a atelectasia durante uma anestesia (Hedenstierna *et al.*, 1986). O mecanismo principal proposto para sensor de O_2 das CMLAPs é baseado naquilo que é conhecido como teoria *redox* (Archer *et al.*, 1993), a qual propõe que o receptor mitocondrial de O_2 nas CMLAPs, o complexo I e III da cadeia transportadora de electrões mitocondrial, gere espécies reactivas de O_2 (ROS) de modo proporcional à PO_2 . Normalmente, o mediador redox mantém os canais de K^+ dependentes de voltagem sensíveis ao O_2 em estado oxidado e de abertura, mas durante a hipoxia o aumento de ROS inibe os referidos canais de K^+ (Post *et al.*, 1992), e causa despolarização das CMLAPs, o que vai permitir o aumento do influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L, e promover a vasoconstrição (Archer *et al.*, 2001;Archer & Michelakis, 2002;Michelakis *et al.*, 2004;Moudgil *et al.*, 2005). Contudo, outros investigadores contrapõem argumentando que o aumento da geração de ROS

mitocondrial está presente durante a hipoxia, e é essencial para estabilizar o factor induzido pela hipoxia-1, o HIF-1 (Chandel & Schumacker, 2000;Waypa *et al.*, 2001;Waypa *et al.*, 2002;Guzy *et al.*, 2005;Waypa & Schumacker, 2005). Outras hipóteses para os sensores de O₂ nas CMLAPs são os canais de K⁺ como estruturas intrinsecamente sensíveis ao O₂, respondendo por diminuição da probabilidade de abertura (Lopez-Barneo *et al.*, 1999), ou que a hipoxia possa causar uma mobilização de ADP-ribose cíclica dependente de Ca²⁺ dos locais de armazenamento sensíveis à cafeína, com a subsequente inibição dos canais de K⁺ (Post *et al.*, 1995;Wilson *et al.*, 2001;Fujishiro *et al.*, 2004).

1.4.2.5 Corpos neuroepiteliais intrapulmonares como quimiorreceptores

Os CNEs, nome dado por Lauweryns e Peuskens no início dos anos 70 do século passado para descrever os ninhos de células muito innervados com características neuroendócrinas e amplamente distribuídos no epitélio das vias aéreas dos mamíferos (Lauweryns & Peuskens, 1972;Cutz & Jackson, 1999;Cutz *et al.*, 2009). Mais tarde, foi demonstrado em coelhos recém-nascidos que os CNEs respondem mais à hipoxia das vias aéreas do que à hipoxemia do sangue pulmonar, aumentando a exocitose das suas vesículas de centro denso e diminuindo a aminofluorescência do citoplasma. Isto implica secreção de amins (principalmente serotonina), mediada pela hipoxia, e sugere que os CNEs funcionam como sensores de hipoxia das vias aéreas (Lauweryns & Cokelaere, 1973;Lauweryns *et al.*, 1977;Lauweryns *et al.*, 1978;Cutz & Jackson, 1999;Fu *et al.*, 2002b). O mecanismo sensor de O₂ nos CNEs parece consistir numa proteína de membrana capaz de se ligar ao O₂. A nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase ligada ao heme é a candidata mais provável, inibindo o canal de K⁺-sensível ao O₂ através de alteração do potencial *redox* intracelular, e conduzindo à despolarização e neurosecreção (Youngson *et al.*, 1993;Fu *et al.*, 2000). O estudo para investigar o sensor de O₂ a nível dos CNEs encontra-se em evolução, e têm sido sugeridos vários mecanismos moleculares, tais como *feedback* positivo pela activação dos autoreceptores de serotonina ou 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃), modulação pelos receptores nicotínicos da ACh heteromericos $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$, e os receptores purinérgicos (Fu *et al.*, 2001;Fu *et al.*, 2002a;Fu *et al.*, 2002b;Kemp *et al.*, 2003;Fu *et al.*, 2003;Fu *et al.*, 2004). Para além do seu envolvimento na regulação da ventilação via quimioaferentes

conduzidos pelo nervo vago, os CNEs modulam o tonus broncomotor ao terem como alvo o músculo liso brônquico e os nervos imediatamente circundantes, promovem e regulam o crescimento das vias aéreas em desenvolvimento ao estimularem a proliferação da endoderme local, e estão envolvidos na adaptação ventilatória neonatal (Hoyt, Jr. *et al.*, 1982; Hoyt, Jr. *et al.*, 1990; Hoyt, Jr. *et al.*, 1991; Hoyt, Jr. *et al.*, 1993; Cutz & Jackson, 1999; Reynolds *et al.*, 2000; Van, 2001; Pan *et al.*, 2004).

1.4.2.6 Células cromafins da medula supra-renal como quimiorreceptores

As células cromafins da medula supra-renal (CCMSRs) são directamente sensíveis ao O₂, particularmente no período perinatal, quando o estímulo hipoxico, nomeadamente durante o parto, é tornado adequado pela secreção de catecolaminas da medula supra-renal (Lagercrantz & Bistoletti, 1977; Seidler & Slotkin, 1985). Contrariamente ao seu papel nos CNEs, a NADPH oxidase não parece funcionar como o sensor primário do O₂ nas CCMSRs (Thompson *et al.*, 2002). Foram propostos: um mecanismo metabólico mitocondrial via bloqueio do complexo I, com diminuição das ROS, o que conduz a uma inibição das correntes de K⁺ e consequente secreção de catecolaminas (Inoue *et al.*, 1998), e um mecanismo de membrana onde determinados canais de K⁺ (canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺ de baixa condutância), são desactivados directamente pela hipoxia e causam uma redução de múltiplas correntes de K⁺, e portanto secreção de catecolaminas (Thompson & Nurse, 1998; Keating *et al.*, 2001; Fearon *et al.*, 2002). Como será discutido mais tarde, estes dois mecanismos são também os dois principais que são propostos para a quimiotransdução a nível do corpo carotídeo. Também foi demonstrado que as CCMSRs têm propriedades sensoras de CO₂, com influxo de Ca²⁺ extracelular e libertação de catecolaminas (Munoz-Cabello *et al.*, 2005), e que a hipoxia e a acidose hipercapnica produzem uma resposta secretória potente, mais do que simplesmente aditiva (Rico *et al.*, 2005).

1.5 O CORPO CAROTÍDEO

Todos os mamíferos investigados até à data têm quimiorreceptores carotídeos, dos quais o corpo carotídeo é universalmente aceite como sendo o local *major* de quimiorrecepção periférica, e o principal sensor de O₂ de todo o organismo

(Biscoe, 1971; Marshall, 1994; Gonzalez *et al.*, 1994; Prabhakar, 2000; Lopez-Barneo *et al.*, 2001; Kumar & Bin-Jaliah, 2007).

1.5.1 História do corpo carotídeo

O corpo carotídeo foi inicialmente descrito por anatomistas na primeira metade do século dezoito, mas a sua natureza quimiossensitiva ou quimiossensora e importância fisiológica no controlo da ventilação só foi dada a conhecer cerca de dois séculos mais tarde através dos estudos de Fernando De Castro em Espanha e de Cornneille Heymans na Bélgica (Heymans & Bouckaert, 1930; De Castro, 2009b). Desde então, a investigação tem sido dirigida para o estudo da estrutura do corpo carotídeo e das consequências dos reflexos originados pela sua estimulação, e mais tarde para a natureza dos seus sensores, dos mecanismos de quimiotransdução e do papel dos seus vários neurotransmissores e neuromoduladores (Peers, 1997; Prabhakar, 2000; Lopez-Barneo *et al.*, 2001; Iturriaga & Alcayaga, 2004; Nurse, 2005). Paralelamente aos esforços para entender a sua fisiologia, as implicações clínicas têm sido sempre tomadas em conta: desde a inicial introdução da glomectomia no tratamento cirúrgico da asma brônquica, apesar deste procedimento ser mais tarde banido (Nakayama 1961; Keim, 1964; Sullivan, 1980); até à utilização mais moderna do corpo carotídeo como potencial fonte de dador no transplante neuronal para tratar a doença de Parkinson (Toledo-Aral *et al.*, 2003; Rafael, 2004; Yu *et al.*, 2005).

1.5.1.1 Descrições anatómicas iniciais

A data precisa da detecção anatómica do corpo carotídeo é discutível, mas parece que terá sido o anatomista francês nascido na Dinamarca Jacques-Benigne Winslow o primeiro a identificá-lo à volta do ano de 1730. Actualmente, o nome comum do tecido glómico carotídeo é corpo carotídeo (De Castro, 2009b).

1.5.1.2 O corpo carotídeo como órgão sensitivo

De Castro (1928) demonstrou que as grandes células epitelióides que compõem a maior parte do corpo carotídeo são inervadas pelas fibras aferentes do glossofaríngeo, incluídas no nervo do seio carotídeo. Ele demonstrou-o seccionando o nervo glossofaríngeo, quer distalmente (extracraniano) quer proximalmente (intracraniano, ao nível da raiz do nervo), em relação ao gânglio

petroso, e subsequentemente examinando as terminações nervosas vizinhas das células do corpo carotídeo. Ele descobriu que antes de 10 dias só degeneravam as terminações nervosas resultantes da secção distal do nervo, e a degeneração resultante da secção intracraniana só ocorria se decorressem pelo menos 10 a 12 dias. Por conseguinte, ele demonstrou que os corpos celulares dos neurónios que inervam o corpo carotídeo se encontram no gânglio petroso, o qual é conhecido por só possuir neurónios monopolares, e não na medula. Mais ainda, o parênquima do corpo carotídeo permanece inalterado após simpatectomia cervical. As descobertas neurohistológicas de De Castro providenciam a primeira evidência que o órgão tem mais um papel sensitivo do que glandular. Ele sugeriu que a função do corpo carotídeo era a de analisar a composição química do sangue, enviando mensagens importantes para os centros medulares cardiovascular e respiratório (Neil, 1973a; De Castro, 2009a; De Castro, 2009b). Os estudos mais avançados de microscopia electrónica realizados décadas depois do trabalho inicial de De Castro vieram confirmar as suas descobertas (Abbott *et al.*, 1972; Hess & Zapata, 1972).

1.5.1.3 O corpo carotídeo está envolvido no controlo reflexogénico da ventilação

Na época, ainda desconhecedores das descobertas de De Castro, Heymans e os seus colaboradores demonstraram que as respostas reflexas de hiperventilação à hipoxia, hipercapnia e acidose eram dependentes da integridade da inervação do corpo carotídeo. A história desta descoberta notável iniciou-se no final de uma experiência que examinava os reflexos dos quimiorreceptores do cão: o animal, cuja bifurcação das carótidas estava unilateralmente denervada, ainda estava em boas condições experimentais, e então Heymans decidiu testar o efeito de uma injeção de uma pequena dose de cianeto na artéria carótida de cada lado. Na altura acreditava-se que o efeito de hiperventilação deste fármaco se devia a um efeito directo nos centros respiratórios medulares. A injeção do fármaco no lado intacto resultou, tal como era esperado, em hiperventilação, mas não foi obtida qualquer resposta aquando da injeção no lado denervado. Este procedimento foi repetido diversas vezes, e foi observado sempre o mesmo resultado. Então percebeu-se que o cianeto provocava um reflexo químico a nível da bifurcação da carótida, e não a nível central, e ficou pela primeira vez demonstrado o

quimiorreflexo carotídeo provocado por anoxia histotóxica. Foram realizados estudos posteriores de perfusão cruzada para testar os efeitos da hipoxia, hipercapnia e acidose, e os resultados obtidos destas experiências ajudaram a revelar “*the part played by vascular pressore- and quimo-receptors in respiratory control*”, e foram publicados no início dos anos 30 do século XX, e tornaram Heymans num prémio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1938 (Heymans & Bouckaert, 1930; Neil, 1973b).

1.5.2 Organização estrutural do corpo carotídeo

1.5.2.1 Anatomia, vascularização e inervação

O corpo carotídeo dos mamíferos é um órgão pequeno localizado bilateralmente na vizinhança da bifurcação das artérias carótidas primitivas. A relação precisa com os vasos originários da artéria carótida primitiva varia com a espécie animal (Gonzalez *et al.*, 1994). Geralmente tem forma oval, com o eixo maior paralelo à artéria carótida primitiva, encontrando-se rodeado de tecido conjuntivo laxo com grande conteúdo de tecido gordo. Contudo, o seu pólo caudal encontra-se ligado por tecido conjuntivo fibroso, o ligamento de Mayer, à parte média da bifurcação (Berne, 2004). A irrigação do corpo carotídeo é realizada por uma ou mais artérias pequenas, ramos da bifurcação da carótida interna ou da externa. A artéria do corpo carotídeo atravessa o órgão, ramificando-se em poucas colaterais, e continua para irrigar o gânglio cervical superior (Santer & Owen, 1986). A drenagem venosa é realizada para a veia jugular interna através de uma ou duas pequenas veias que se originam de um denso plexo vascular na superfície do órgão. O corpo carotídeo é um órgão muito vascularizado, com um leito vascular complexo de sinusóides anastomosantes tortuosos (McDonald, 1983; McDonald & Larue, 1983). A sua extensa vascularização (um terço a um quarto do tecido do corpo carotídeo do gato é ocupado por capilares e vénulas) excede a do cérebro por um factor de cinco ou seis (McDonald, 1983; McDonald & Larue, 1983). Tal como já referido, o fornecimento nervoso aferente do corpo carotídeo é conduzido no nervo do seio carotídeo (NSC), um ramo do nervo glossofaríngeo, cujos corpos celulares de origem se encontram no gânglio petroso (vd 1.5.1.2. acima). As projecções centrais deste gânglio terminam no NTS, e representam uma parte muito importante da informação necessária para

regular a actividade ventilatória. Sabe-se que diversos estímulos com origem no sangue aumentam a actividade quimioafereente do NSC (vd 1.5.3. abaixo). Pequenas fibras provenientes do nervo vago juntam-se ao NSC na sua viagem até ao corpo carotídeo. O gânglio cervical superior fornece ao corpo carotídeo inervação simpática via nervos gânglioglomerulares, e o próprio NSC transporta eferentes simpáticos e parassimpáticos para este órgão (Gonzalez *et al.*, 1994). Os eferentes simpáticos têm um efeito excitatório, provavelmente por diminuírem o fluxo sanguíneo do corpo carotídeo, o qual pode ser bloqueado por antagonistas dos receptores α . Pelo contrário, a estimulação parassimpática reduz a actividade quimioafereente e aumenta o fluxo sanguíneo do corpo carotídeo (Neil & O'Reagen, 1971a; Neil & O'Reagen, 1971b; Acker & O'Regan, 1981; O'Regan, 1981; McDonald, 1983).

1.5.2.2 Características histológicas do corpo carotídeo

O corpo carotídeo é rodeado por uma cápsula de tecido conjuntivo com colagénio denso, a qual é atravessada por nervos, veias (principalmente no pólo superior), e artérias (principalmente no pólo inferior). Prolongamentos de tecido conjuntivo formando septos partem da face interna da cápsula e dividem o órgão em lobos, e cada lobo é subdividido por septos mais finos em lóbulos ou glomérulos. De acordo com a densidade do tecido conjuntivo, são observados diferentes aspectos histológicos, isto é desde um tipo compacto com densos ninhos celulares como no gato ou rato, a um tipo difuso com ninhos celulares semeados em grandes áreas como no coelho, ou um tipo intermédio como no porco (Sisson *et al.*, 1975).

Em cada lóbulo, as células parenquimatosas estão em íntima relação com numerosos nervos e capilares. Estas células são de dois tipos principais: 1) A célula glómica tipo I, também conhecida por célula principal, é o local chave da quimiorrecepção, está em contacto sináptico com as terminações nervosas do NSC e estabelece sinapses recíprocas químicas e eléctricas com outras células tipo I; 2) A célula glómica tipo II, ou célula de sustentação, que se acredita desde há muito tempo exercer um papel de suporte tipo glia, possivelmente por ajustar a disposição das células de tipo I em relação às terminações nervosas. Há centenas de milhares de células tipo I em cada corpo carotídeo, sendo seis vezes mais abundantes do que as células tipo II na maior parte das espécies. As

células tipo I possuem uma forma arredondada ou oval, são pequenas (8-12 micra de diâmetro) com núcleo claro e arredondado, mitocôndrias abundantes e numerosas vesículas citoplasmáticas contendo catecolaminas (dopamina e noradrenalina - NA) em vesículas de centro denso, ou acetilcolina em vesículas claras. Elas também armazenam numerosas substâncias como neuropéptidos, nucleótidos e enzimas necessárias para produzir gases mensageiros como o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO). As células tipo II estão localizadas na periferia do glomérulo, possuem núcleo discóide e numerosos filamentos de actina, não tendo o citoplasma um aspecto granular. As terminações nervosas apresentam mitocôndrias e vesículas pequenas, e são provavelmente o local de quimiotransdução para alguns estímulos (Barbe *et al.*, 2002). Cada célula tipo I tem a sua própria conexão nervosa, e provavelmente até a mais do que uma fibra nervosa, e normalmente 4-8 axônios terminam numa célula. Estão extensamente ligadas por *gap-junctions*, não só umas às outras, mas também com células tipo II e com terminações nervosas do NSC (Gonzalez *et al.*, 1994; Kondo & Iwasa, 1996; Eyzaguirre, 2000; Putnam *et al.*, 2004).

O corpo carotídeo é um órgão neuroendócrino derivado da crista neural, e a sua origem embrionária foi pela primeira vez demonstrada no início dos anos 70 do século XX, em pássaros (Pearse *et al.*, 1973). Posteriormente, Kondo e colaboradores demonstraram (1982) a mesma origem embrionária nos mamíferos. Eles verificaram que as células tipo I podem ser identificadas com anticorpos anti-enolase específica neuronal, e as células tipo II com anticorpos anti-proteína S-100, um marcador específico da glia (Kondo *et al.*, 1982). Mais ainda, a presença de tirosina hidroxilase (TH), e dopamina β -hidroxilase (DBH) nas células quimiorreceptoras também indica a sua natureza neuronal (Lawson, 1980; Gonzalez *et al.*, 1994).

1.5.2.3 Características metabólicas do corpo carotídeo

O fluxo sanguíneo total do corpo carotídeo foi estimado usando diversos métodos, tais como a medida do efluente venoso por métodos gravimétricos ou microsferas radioactivas. Os resultados indicam que, relativamente ao seu tamanho, este órgão tem o maior fluxo sanguíneo de todos os órgãos, isto é $2\text{L } 100\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, na presença de valores de gases sanguíneos e pressão arterial

dentro da normalidade. Este valor excede, por exemplo, o do fluxo sanguíneo cerebral nos humanos em mais de 15 vezes. Este facto não é inesperado, tendo em conta a marcada vascularização deste órgão. De facto, esta característica permite um fornecimento significativamente elevado de O_2 ao corpo carotídeo, tendo em vista assegurar um metabolismo muito activo, mesmo em condições de hipoxia grave (Purves, 1970; Acker & O'Regan, 1981; O'Regan, 1981; Acker, 1987; Kety, 1987; Barnett *et al.*, 1988; Gonzalez *et al.*, 1994).

Foi constatado que, em repouso, os valores do consumo de O_2 no corpo carotídeo variam quando se comparam diferentes experiências, quer *in vivo*, quer *in vitro*: desde valores tão baixos como $0,6 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ a tão elevados como $9 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (De Burgh, 1954; Fay, 1970; Leitner & Liaubet, 1971; Whalen & Nair, 1975; Starlinger & Lubbers, 1976; Whalen & Nair, 1976; O'Regan, 1979; Whalen *et al.*, 1981; Buerk *et al.*, 1989a). Esta variabilidade pode ser atribuída, pelo menos em parte, às diferenças técnicas entre os métodos experimentais utilizados. Por exemplo, a diferença arteriovenosa ou as curvas de desaparecimento de O_2 após a interrupção de fluxo num corpo carotídeo perfundido fornecem valores numéricos diferentes de consumo de oxigénio, conforme o método e duração da perfusão, e a natureza do perfundido, o qual dita o resultado no último método. A avaliação do peso do corpo carotídeo, o coeficiente escolhido para solubilidade do O_2 e as anastomoses arteriovenosas também tornam a quantificação difícil. Contudo, o valor sugerido por Whalen & Nair (1983), o qual é $1,3 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ parece ser o mais credível para as preparações de corpo carotídeo quer *in vivo* quer *in vitro* (Gonzalez *et al.*, 1994; Jones, 2004).

Outro resultado controverso, com valores díspares obtidos por diferentes grupos de investigadores, é o preciso nível de PO_2 tecidular do corpo carotídeo necessário para funcionar como estímulo para a actividade do quimiorreceptor. Por exemplo, Acker e colaboradores (1971) usando eléctrodos de O_2 obtiveram valores baixos de 7-20 mmHg a uma PaO_2 de 100 mmHg, enquanto que Whalen & Nair (1975) revelaram valores mais elevados de 70 mmHg. Mais tarde, Rumsey e colaboradores (1991), usando uma técnica óptica que evita a lesão tecidular provocada pela inserção de eléctrodos de O_2 , obtiveram o valor de 23 mmHg. Quando repetiram o estudo, usando sangue e não soro fisiológico

equilibrado, obtiveram o valor de 53 mmHg. De facto, o gradiente de PO_2 entre os capilares e as células parenquimatosas do centro lobular foi estimado como sendo de 10-20 mmHg (Acker, 1987). Rumsey e colaboradores definiram a dupla função que o oxigénio desempenha a nível do corpo carotídeo: primeiro, é a diminuição da PO_2 vascular que inicia o processo de quimiorrecepção do oxigénio; segundo, o oxigénio é necessário para providenciar a energia suficiente para manter as respostas quimiossensitivas. Definiram que valores de PO_2 tecidulares inferiores a 10 mmHg podem forçar as células quimiosensoras a metabolismo anaeróbio, e assistir-se a uma diminuição da descarga na presença de hipoxia grave extrema (Eyzaguirre & Lewin, 1961b; Rumsey *et al.*, 1991). Como um todo, a actividade do corpo carotídeo parece ser tónica, mesmo durante a hiperoxia, não tendo um limiar fisiológico absoluto: a descarga do quimiorreceptor aumenta abruptamente com uma PaO_2 de por exemplo 70-75 mmHg, e atinge o máximo de actividade com uma PaO_2 de 10-20 mmHg. Parece que diferentes fibras têm diferentes limiares e picos de actividade (Fidone & Sato, 1969; Biscoe *et al.*, 1970b).

No que respeita ao efeito da hipoxia no metabolismo, espera-se que o corpo carotídeo, como quimiorreceptor, aumente a sua actividade durante a hipoxia com o objectivo de cumprir a sua tarefa de iniciar os reflexos homeostáticos. Apesar de alguns estudos não revelarem alteração (Starlinger & Lubbers, 1976) ou até diminuição (Acker & Lubbers, 1975; Nair *et al.*, 1986; Buerk *et al.*, 1989bb) nos níveis de consumo de O_2 do corpo carotídeo sob baixa PO_2 , a incubação do corpo carotídeo durante 5 a 10 min numa solução com hipoxia moderada (20% O_2 em N_2), resultou num aumento do consumo da glicose e oxidação de 44%, medidos utilizando a técnica da 2-desoxiglucose (Obeso *et al.*, 1989bb; Obeso *et al.*, 1993). Mais ainda, Rumsey e colaboradores, usando a sua técnica óptica, demonstraram um aumento na razão do desaparecimento de O_2 quando a descarga do NSC aumenta (Rumsey *et al.*, 1991).

1.5.3 Os estímulos do corpo carotídeo

O corpo carotídeo é sensível a uma variedade de estímulos químicos, e até físicos. Estes incluem hipercapnia e acidose, estímulos partilhados com os quimiorreceptores centrais, mas este órgão é único quanto a ser o sensor primário da hipoxia. Tipicamente, um estímulo desencadeia o processo de

quimiotransdução levando a um aumento da frequência de descarga das fibras quimiossensoras aferentes do NSC, o que por sua vez vai influenciar o funcionamento integrado do centro respiratório. Portanto, o corpo carotídeo pode iniciar ou modificar reflexos cardiorespiratórios tendo em vista manter as pressões parciais dos gases e acidez sanguíneas (Eyzaguirre & Zapata, 1984; Gonzalez *et al.*, 1994; Prabhakar, 2000; Lahiri & Forster, 2003).

1.5.3.1 Hipoxia

A hipoxia é o estímulo do corpo carotídeo mais reconhecido e de características únicas, e praticamente todas as respostas cardiorespiratórias à hipoxia aguda são mediadas por este órgão (Biscoe, 1971; Whipp & Wasserman, 1980; Marshall, 1994; Gonzalez *et al.*, 1994; Prabhakar, 2000; Lopez-Barneo *et al.*, 2001). Mais do que o conteúdo em O_2 do sangue arterial (CaO_2), é a redução da pressão parcial de O_2 (PaO_2) no sangue arterial que estimula o corpo carotídeo. Esse é o motivo pelo qual numa hipoxia por anemia, a qual está associada a uma redução do CaO_2 e não da PaO_2 , a hipoxia não representa um estímulo importante para o corpo carotídeo, mas sim para os quimiorreceptores aórticos (Hatcher *et al.*, 1978; Lahiri *et al.*, 1981). Os outros três tipos de hipoxia, isto é a hipoxia hipóxica, a hipoxia por estase e a hipoxia histotóxica são estímulos muito poderosos para o corpo carotídeo (Duke *et al.*, 1952; Fitzgerald *et al.*, 1990; Matsuoka *et al.*, 1994). A resposta do corpo carotídeo à hipoxia tem um início rápido, e não se adapta. As descargas aferentes do NSC aumentam exponencialmente com o aumento da hipoxia a $PaCO_2$ constante, e as inflexões das diferentes fibras quimiorreceptoras ocorre entre os limites fisiológicos de 60-100 mmHg (Hornbein *et al.*, 1961; Eyzaguirre & Lewin, 1961bb; Biscoe *et al.*, 1970b). Diversas hipóteses (1.5.4. abaixo) têm sido sugeridas para o processo de quimiotransdução iniciado pela hipoxia no corpo carotídeo, mas encontrar o sensor último de O_2 ainda se encontra por resolver e é actualmente, juntamente com os resultados da maturação e plasticidade do corpo carotídeo, a corrente de pesquisa predominante a nível da quimiorrecepção arterial.

1.5.3.2 Hiperapnia

Uma subida da $PaCO_2$ sob PaO_2 constante também estimula os quimioaferentes carotídeos, e os dados apontam para que 30-40 % das alterações ventilatórias

induzidas pela hipercapnia sejam mediadas pelo corpo carotídeo (Bruce & Cherniack, 1987). O limiar de excitação do corpo carotídeo em resposta ao CO_2 parece ser 25 mmHg (Eyzaguirre & Lewin, 1961b). Acima deste nível, a resposta é linear durante os limites fisiológicos e tende para um *plateau* em níveis muito elevados de PaCO_2 , isto é acima de 100 mmHg (Lahiri & Forster, 2003). A resposta é caracterizada por uma frequência de disparo inicial rápida, seguido por uma fase de adaptação e depois estabilização a um nível mais baixo (Black *et al.*, 1971; Andronikou *et al.*, 1988).

Apesar do CO_2 *per se* não poder ser excluído como molécula sinalizadora, como se observa numa perfusão do corpo carotídeo com soluções hipercápnicas isohídricas conduzindo a um aumento da libertação de dopamina e a um aumento das descargas do NSC (Rigual *et al.*, 1984; Rigual *et al.*, 1985; Putnam *et al.*, 2004), é geralmente aceite que a estimulação hipercápnica tome lugar após a acidificação simultânea, isto é hidratação do CO_2 a ácido carbónico pelo enzima anidrase carbónica (AC). Há evidência de que é a mudança do pH intracelular, e não extracelular, o importante para a resposta da célula glômica à hipercapnia (Hanson *et al.*, 1978). Estes autores demonstraram que o aumento da frequência de disparo do NSC induzido pela hipercapnia é reduzido quando é usado um inibidor da AC que passa a membrana celular, nomeadamente a acetazolamina, mas não quando é usado um inibidor da AC que não pasa a membrana, nomeadamente a benzolamida. Para além da evidência histoquímica da localização da AC no interior das células tipo I (Ridderstrale & Hanson, 1984; Rigual *et al.*, 1985; Nurse, 1990; Forster, 1993), estas células contêm numerosos transportadores reguladores de pH, isto é a proteína trocadora de Na^+/H^+ , a proteína trocadora de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediada pelo Na^+ e os canais de HCO_3^- , e também tem sido sugerido o provável papel de outras estruturas diferentes como canais de K^+ TASK-1, canais de Ca^{2+} tipo-L, canais de Cl^- , purinas e receptores de purinas na sinalização da hipercapnia a nível dos quimiossensores (Iturriaga *et al.*, 1991; Peers & Green, 1991; Buckler *et al.*, 1991a; Buckler *et al.*, 1991b; Buckler & Vaughan-Jones, 1994a; Buckler *et al.*, 2000; Petheo *et al.*, 2001; Summers *et al.*, 2002).

1.5.3.3 Acidose

A acidose, quer ela seja respiratória ou metabólica, é outro estímulo clássico do corpo carotídeo, e as evidências apontam no sentido de que o aumento da actividade quimiorreceptora seja característica e única como resposta ao pH, e independente da $PaCO_2$ ou do bicarbonato (Gray, 1968; Biscoe *et al.*, 1970bb; Black *et al.*, 1971; Rigual *et al.*, 1991). A resposta ventilatória à acidose metabólica aguda do exercício parece ser mediada única e exclusivamente pelos corpos carotídeos (Whipp & Wasserman, 1980). A acidose metabólica induzida experimentalmente por injeções de ácido láctico aumenta o efeito da hipoxia e hipercapnia no corpo carotídeo de gato, mas o seu efeito próprio é inferior ao do efeito excitatório do CO_2 para o mesmo aumento de $[H^+]$ arterial (Pokorski & Lahiri, 1983). O perfil do estímulo-resposta à acidose, tal como aquele à $PaCO_2$, é linear até um certo nível, isto é <6.9 , altura em que tende para um *plateau* (Lahiri & Forster, 2003).

1.5.3.4 Hipotensão e hipoperfusão

A redução do fluxo sanguíneo devida à hipotensão ou vasoconstrição grave pode causar hipoxia de estase, e portanto estimular o corpo carotídeo. De facto, independentemente da hipotensão causar uma redução do fluxo sanguíneo total do corpo carotídeo (De Burgh *et al.*, 1954; Purves, 1970), não parece afectar a PO_2 tecidual do órgão, provavelmente devido a uma autoregulação eficaz do fluxo sanguíneo total durante as alterações da pressão de perfusão (Acker & Lubbers, 1975; Acker & O'Regan, 1981). A actividade quimioaférente carotídea praticamente não se altera dentro dos limites de pressão arterial média (PAM) entre 70 e 160 mmHg. Só uma redução da PAM abaixo de 60 mmHg pode causar um pequeno aumento da actividade quimioaférente, uma resposta que não é tão marcada como aquela dos quimiorreceptores aórticos a um estímulo semelhante (Landgren & Neil, 1951; Lee *et al.*, 1964; Biscoe *et al.*, 1970a; Biscoe *et al.*, 1970b; Lahiri *et al.*, 1980).

1.5.3.5 Hipercaliemia

A hipercaliemia aumenta a descarga quimioaférente carotídea (Jarisch *et al.*, 1952; Linton & Band, 1985; Jarisch *et al.*, 1986). A relação entre a descarga e o nível crescente da $[K^+]$ arterial, obtida por infusão sistémica, é curvilínea com

uma resposta mais marcada nas concentrações mais elevadas (Paterson & Nye, 1988). Em relação a outros estímulos, a hipoxia sistémica foi associada a hipercaliemia (Paterson et al., 1988). Contudo, a estimulação do corpo carotídeo pela hipercaliemia per si foi encontrada em normoxia e aumentada pela hipoxia, mas não foi abolida pela hiperoxia (Burger et al., 1988; Sneyd et al., 1988). No estado fisiológico de exercício, os músculos libertam K⁺ no fluído extracelular causando hipercaliemia, sendo proposto um papel desta hipercaliemia na hiperpneia mediada pelo exercício (Linton et al., 1984; Linton & Band, 1985; Paterson et al., 1989; Busse et al., 1991; Paterson, 1992; Paterson et al., 1992).

1.5.3.6 Hipertermia

Muitos estudos electrofisiológicos revelaram que a actividade do corpo carotídeo aumenta com o aumento da temperatura, enquanto que o arrefecimento reduz o potencial de membrana da célula glómica e a frequência de disparo do NSC (Paintal, 1971; McQueen & Eyzaguirre, 1974; Baron & Eyzaguirre, 1975; Baron & Eyzaguirre, 1977; Alcayaga et al., 1993). Foi demonstrado que os efeitos da temperatura na actividade do corpo carotídeo incluem hiperventilação hipertérmica, o que por sua vez conduz a hipocapnia a qual pode reflexamente mascarar os referidos efeitos (Loyola et al., 1991; Zapata et al., 1994; Mortola & Frappell, 2000). Adicionalmente, quanto ao efeito depressor da hiperoxia na ventilação, o qual pode ser tomado como índice funcional da actividade dos quimiorreceptores carotídeos (Dejours, 1962), foi descoberto que diminui mais a actividade inspiratória a 40° do que nos limites de 35 a 37° (Fadic et al., 1991; Iturriaga et al., 1994). Foi sugerido que a elevação da temperatura durante o exercício moderado a intenso aumenta a actividade dos quimiorreceptores do corpo carotídeo (McQueen & Eyzaguirre, 1974; Gallego et al., 1979; Gonzalez et al., 1994). Durante a hipotermia, a contribuição do corpo carotídeo para a diminuição marcada da actividade ventilatória pode explicar até 50% do efeito depressor da hipotermia na ventilação (Oruc & Terzioglu, 1979).

1.5.3.7 Hiperosmolaridade

Encontra-se demonstrado que pequenos aumentos na osmolaridade activam as descargas quimiosensitivas, tanto *in vivo* como *in vitro*, e são obtidos efeitos

opostos com soluções hiposmolares (Gallego *et al.*, 1979; Gallego & Belmonte, 1979). Esta função osmorreceptora do corpo carotídeo pode estar relacionada com a descoberta que a secreção de hormona antidiurética é aumentada pela estimulação do NSC (Michaelis & Gilmore, 1969). Outro significado fisiológico prende-se com a hiperosmolaridade que acompanha o exercício, o qual, juntamente com outras alterações, aumenta a mediação da hiperpneia ao nível do quimiorreceptor arterial (Gonzalez *et al.*, 1994).

1.5.3.8 Hipoglicemia

A infusão intracarotídea de glucose reduz a actividade do quimiorreceptor carotídeo, e a estimulação do corpo carotídeo aumenta a libertação hepática de glucose, bem como a retenção cerebral de glucose (varez-Buylla & de Alvarez-Buylla, 1988; varez-Buylla & de Alvarez-Buylla, 1994; varez-Buylla *et al.*, 1996; varez-Buylla *et al.*, 2003). Subsequentemente, foi proposto para o corpo carotídeo um papel sistémico na regulação de glucose (Koyama *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2003), e evidências recentes, em cortes finos de corpo carotídeo, demonstraram que concentrações baixas de glucose podem estimular a secreção de catecolaminas por parte das células de tipo I (Pardal & Lopez-Barneo, 2002; Lopez-Barneo, 2003). Estudos ainda mais recentes usando uma co-cultura de neurónios petrosos e células tipo I, demonstraram que a glucose baixa consegue estimular gânglios petrosos da mesma unidade quimiosensitiva que é estimulada pela hipoxia ou hipercapnia (Nurse, 2005).

1.5.3.9 Outras substâncias moduladoras circulantes

Injecções de adrenalina e noradrenalina nos vasos carotídeos podem aumentar as descargas quimioaferentes, um efeito causado por vasoconstrição, e marcadamente reduzido por um antagonista dos receptores α -adrenérgicos (Joels & Neil, 1963; Sampson, 1972; Llados & Zapata, 1978). E ainda, o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos reduz substancialmente a sensibilidade dos quimiorreceptores carotídeos à hipoxia e hipercaliemia (Paterson & Nye, 1988). Foi sugerido então que níveis elevados de catecolaminas circulantes, principalmente adrenalina, podem aumentar a quimiossensibilidade do corpo carotídeo em situações particulares como hipoxia sistémica, hemorragia ou exercício (Paterson & Nye, 1988; Marshall, 1994). Outras hormonas que podem

estar elevadas nestas situações incluem a angiotensina II e a vasopressina, e relativamente a ambas ficou demonstrado terem efeitos excitatórios na descarga dos quimiorreceptores (Allen, 1998; Jennings & Lockett, 2000; Fung *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2004). A adenosina e a endotelina também são libertadas no plasma durante a hipoxia, e foi demonstrado aumentarem as descargas quimioaférentes carotídeas (McQueen & Ribeiro, 1981b; Runold *et al.*, 1990; McQueen *et al.*, 1994; McQueen *et al.*, 1995; Vandier *et al.*, 1999; Rey & Iturriaga, 2004).

1.5.3.10 Estímulos experimentais

Vários estímulos experimentais foram utilizados em estudos de efeitos reflexos da estimulação dos quimiorreceptores carotídeos, ou da quimiotransdução do corpo carotídeo. Exemplos destes estímulos são o CO, os desacopladores mitocondriais como o 2,4-dinitrofenol e o carbonil cianide trifluormetoxifenil hidrazona, os inibidores da cadeia de transporte de electrões mitocondrial (como a rotenona, o mixotiazol, a antimicina A, o cianeto e a oligomicina) e 2-deoxi-D-glucose como agente depletador de ATP (Mulligan *et al.*, 1981b; Obeso *et al.*, 1986; Obeso *et al.*, 1989a; Buckler & Vaughan-Jones, 1998; Chandel & Schumacker, 2000; Daudu *et al.*, 2000; Barbe *et al.*, 2002; Ortega-Saenz *et al.*, 2003; Wyatt & Buckler, 2004). Do mesmo modo, vários neurotransmissores hipotéticos, seus agonistas e antagonistas foram utilizados para investigar os seus papéis potenciais no processo de quimiotransdução (ver 1.5.5. abaixo).

1.5.4 Quimiotransdução no corpo carotídeo

As células tipo I do corpo carotídeo são unidades receptor-efector, dado que detectam o estímulo e causam activação dos neurónios sensitivos pós-sinápticos, que por sua vez iniciam uma variedade de reflexos homeostáticos adequados. De facto, estas características celulares assemelham-se à terminação de um fibra nervosa, e acredita-se que elas formem o equivalente a uma sinapse nervo-nervo com as terminações nervosas sensitivas justapostas, gerando potenciais de acção pela libertação de uma série de neurotransmissores que se ligam tanto aos receptores pós-sinápticos, como aos auto-receptores pré-sinápticos das células tipo I. A secreção dos transmissores evocada pelo estímulo é dependente da presença de Ca^{2+} extracelular e da elevação da $[\text{Ca}^{2+}]$ (concentração de cálcio)

citoplasmático dentro das células tipo I. O influxo de íons de cálcio nas células tipo I através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem ocorre como resultado da despolarização da membrana devido à inibição de canais de K^+ (Fidone *et al.*, 1982; Rigual *et al.*, 1984; Rigual *et al.*, 1986; Gonzalez *et al.*, 1994).

Os passos iniciais da quimiotransdução, isto é a natureza e localização do sensor e do efector molecular responsável pela despolarização, bem como do papel dos canais de K^+ , são assuntos em debate: como resultado da realização de numerosos estudos levados a cabo para resolver estas questões, têm sido sugeridas várias hipóteses para o fenómeno da quimiotransdução (Prabhakar, 2000; Chandel & Schumacker, 2000; Gonzalez *et al.*, 2002; Lahiri & Forster, 2003; Lopez-Barneo, 2003; Fujishiro *et al.*, 2004; Lopez-Barneo *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2005; Lahiri *et al.*, 2006). A hipótese da quimiotransdução provocada pela hipoxia, o clássico estímulo do corpo carotídeo, pode ser dividido em dois grupos *major*. O primeiro grupo inclui duas hipóteses intimamente relacionadas que sugerem que o sensor de oxigénio seja uma hemeproteína e/ou uma enzima *redox*-sensível. A hipótese da hemeproteína sugere que a ligação do oxigénio a (ou a libertação do oxigénio de) proteínas contendo heme, mitocondriais ou não mitocondriais, forme o sensor de oxigénio. A hipótese *redox* postula que as alterações na tensão de oxigénio alterem a produção intracelular de ROS, e é a consequente alteração *redox* que inibe a actividade do canal de potássio, e inicia o processo de quimiotransdução. A segunda hipótese *major* de quimiotransdução consequente à hipoxia é a hipótese de membrana, assumindo que a proteína do canal de potássio é o sensor primário de oxigénio, e que a inibição deste canal pela hipoxia é o acontecimento decisivo na quimiotransdução, o qual conduz à despolarização e entrada de Ca^{2+} .

Em relação à hipercapnia, o consenso geral (como mencionado acima, 1.5.3.2.) é que ela estimula as células tipo I via quimiotransdução consequente à acidez, durante a qual a diminuição do pH intracelular desencadeia o processo de transdução. Foram propostas duas hipóteses principais para explicar o porquê da acidose intracelular conduzir a influxo de Ca^{2+} . A primeira é a hipótese da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (TSC), sugerindo que a diminuição do pH pode desencadear uma activação sequencial de NHE e TSC, conduzindo a um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A

segunda é a hipótese de membrana, durante a qual a despolarização da membrana leva a uma redução das correntes de influxo de K^+ e entrada de Ca^{2+} .

1.5.4.1 Hipótese metabólica mitocondrial para o sensor de oxigénio

Esta hipótese foi formulada pela primeira vez no início dos anos 60 do século XX, propondo que a hipoxia actua como os tóxicos metabólicos excitatórios, reduzindo o ATP nas células de tipo I, o que seria o sinal para o processo de quimiotransdução (Joels & Neil, 1963). Contudo, o efeito da hipoxia nos níveis de ATP não se revelou consistente em vários estudos *in vivo* e *in vitro* que se seguiram à proposta inicial: alguns demonstraram níveis de ATP reduzidos (Obeso *et al.*, 1985), e outros não encontraram alterações (Acker & Starlinger, 1984; Verna *et al.*, 1990). Mais tarde, a ideia de um sensor preciso de oxigénio foi sugerida por Mills & Jobsis (Mills & Jobsis, 1972), como sendo uma citocromo oxidase com uma afinidade muito baixa para o O_2 , permitindo que níveis moderados de hipoxia possam causar uma diminuição do ATP, ao mesmo tempo que o normal complexo enzimático de alta afinidade pudesse providenciar a energia necessária para aumentar a actividade celular. A presença de tal citocromo de baixa afinidade foi questionada e, de facto, não foi confirmada em estudos posteriores (Acker & Eyzaguirre, 1987). Contudo, recentemente, foi descoberto um citocromo α_{592} pouco comum, sendo assumido que actua como um componente único da citocromo c oxidase do corpo carotídeo, e proposto ser um sensor de oxigénio com baixa afinidade para o O_2 e alta afinidade para o cianeto (Streller *et al.*, 2002). A proposta do envolvimento da sintetase do óxido nítrico tipo I mitocondrial (NOS-1) e da cadeia respiratória do citocromo c oxidase como sensores de oxigénio foi introduzida pela demonstração da sua interacção proteína-proteína usando estudos de microscopia electrónica de imunolocalização e co – imunoprecipitação (Semenza, 1999; Persichini *et al.*, 2005).

Nos anos 80, a fosforilação oxidativa mitocondrial do ADP em ATP foi olhada como passo crucial na quimiotransdução; foi proposta a razão $[ATP] / ([ADP] + [Pi])$ como sinal desencadeador da resposta do quimiorreceptor. Esta sugestão foi baseada no conhecimento que a oligomicina, um inibidor da ATPase mitocondrial, estimula os quimioaférentes carotídeos e subsequentemente reduz a sua resposta quer à hipoxia quer a tóxicos metabólicos (Mulligan *et al.*,

1981a; Mulligan & Lahiri, 1982; Shirahata *et al.*, 1987). Contudo, outras acções celulares da oligomicina, isto é a inibição da Na^+/K^+ -ATPase dependente e dos canais de Ca^{2+} - K^+ dependentes, poderiam colaborar para o seu efeito excitatório nos quimioaférentes (Garcia-Sancho *et al.*, 1979). O conceito dum sensor de oxigénio via alterações do metabolismo celular foi apoiado pela descoberta que o competidor O_2 -CO a pressões elevadas, > 300 mmHg, estimula o corpo carotídeo. Acredita-se que este efeito excitatório é devido à formação de um complexo-CO com o citocromo a_3 mitocondrial, um importante participante na fosforilação oxidativa, conduzindo a uma redução na respiração celular (Joels & Neil, 1962; Lahiri & DeLaney, 1975; Lahiri *et al.*, 1993a; Lahiri *et al.*, 1994; Lahiri *et al.*, 1995; Lahiri *et al.*, 1997a; Barbe *et al.*, 2002).

Biscoe e colaboradores demonstraram que a hipoxia causa despolarização mitocondrial nas células tipo I do corpo carotídeo em níveis de PO_2 mais elevados do que aqueles necessários para despolarizar as mitocôndrias dos neurónios sensitivos (Biscoe *et al.*, 1989). O efeito da hipoxia no potencial electroquímico e estado *redox* das mitocôndrias foi então estudado nas células tipo I e comparado com células não quimiossensoras, como as células da medula supra-renal e os neurónios sensitivos. A nível das células tipo I, o potencial electroquímico diminui e as mitocôndrias tornam-se mais reduzidas num limiar hipóxico mais baixo, PO_2 de 60 mmHg, comparado com, por exemplo, 10 mmHg nas células controlo, e demonstrou-se que este efeito da hipoxia no potencial electroquímico das células tipo I está correlacionado com um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugerindo que provavelmente as mitocôndrias contribuem em grande escala para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante a hipoxia (Biscoe & Duchon, 1990a; Biscoe & Duchon, 1990b; Duchon & Biscoe, 1992a; Duchon & Biscoe, 1992b). Apesar dos referidos estudos, a hipótese metabólica mitocondrial não é universalmente aceite, tal como permanece por esclarecer o mecanismo exacto através do qual a despolarização da membrana mitocondrial ou o estado *redox* está relacionado com o aumento da actividade do NSC. Por exemplo, a conclusão a que chegaram Biscoe & Duchon de que a mitocôndria é a fonte do aumento de Ca^{2+} citosólico foi considerada um “erro fatal” (Fujishiro *et al.*, 2004), uma crítica baseada em demonstrações, realizadas em células tipo I do corpo carotídeo e outras células sensíveis ao O_2 , da dependência do influxo Ca^{2+} extracelular via canais de Ca^{2+}

dependentes da voltagem (Urena *et al.*, 1994; Buckler & Vaughan-Jones, 1994b; Inoue *et al.*, 1998). Além do mais, a natureza da alteração, isto é diminuição ou aumento, e o contribuinte *major* entre os diferentes complexos mitocondriais da produção mitocondrial de ROS evocada pela hipoxia ainda é um assunto incerto no estudo dos tecidos sensíveis ao oxigénio (Chandel & Schumacker, 2000; Michelakis *et al.*, 2002; Ortega-Saenz *et al.*, 2003; Ward, 2003; Guzy *et al.*, 2005; Waypa & Schumacker, 2005).

1.5.4.2 Enzimas não mitocondriais contendo heme como sensores de oxigénio

Várias enzimas não mitocondriais contendo o grupo heme, dependentes da PO_2 , foram propostas como potenciais sensores de O_2 nas células tipo I do corpo carotídeo. Estas incluem oxidases do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH), sintetases do óxido nítrico (NOS) e heme-oxigenases (HO) (Hoshi & Lahiri, 2004).

O NADPH é um complexo enzimático celular formado pela ligação das suas proteínas citosólicas ($p47^{PHOX}$; PHOX de *PHagocyte OXidase*, $p67^{PHOX}$ and $p40^{PHOX}$) às suas duas subunidades ($gp91^{PHOX}$ and $p22^{PHOX}$) do flavocitocromo ligado à membrana e contendo heme (Sanders *et al.*, 2002). Esta enzima, cujas subunidades foram identificadas nas células tipo I do corpo carotídeo, depende do O_2 para produzir ROS como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e o seu papel como sensor de O_2 foi apresentado inicialmente por Acker e colaboradores. Propuseram que a hipoxia diminuiria a produção de H_2O_2 , e tal diminuição modificaria a condutância dos canais de K^+ , produzindo despolarização celular e libertação de neurotransmissores dependente de Ca^{2+} , via alteração quer a nível da guanosina monofosfato cíclica (cGMP) quer do estado *redox* do glutatião (Acker *et al.*, 1989; Cross *et al.*, 1990; Acker *et al.*, 1992; Acker, 1994ab; Acker, 1994ba). Tal hipótese assenta em estudos que utilizam o difenileno iodonium, um inibidor da NADPH oxidase. Outros autores argumentaram que tal inibidor é também um inibidor não específico de enzimas contendo flavoproteínas, incluindo oxidases de membrana (NADH e NADPH), NOS e o complexo I da cadeia transportadora de electrões (ETC) mitocondrial, podendo também bloquear canais de Ca^{2+} (Wyatt *et al.*, 1994; Prabhakar, 2000). Mais ainda, outros inibidores da NADPH oxidase, como o óxido de fenilarsina e neopterina, não afectam a libertação de catecolaminas em normóxia nem alteram a padrão de

libertação evocada pela hipoxia (Obeso *et al.*, 1999). Outro facto que questiona esta hipótese é a demonstração da inibição da abertura dos canais de K^+ evocada pela hipoxia em *patches* de membrana de células tipo I isolados e perfundidos com soro fisiológico, nos quais foram excluídos factores citoplasmáticos (Ganforina & Lopez-Barneo, 1991). Também foi demonstrado que a actividade de sensor de O_2 é preservada em ratinhos deficientes numa subunidades seleccionada da NADPH oxidase, isto é a subunidade $gp9^{PHOX}$ (Archer *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2000a; He *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003). Este facto pode indicar que a geração de ROS pela NADPH oxidase é ainda funcionante, provavelmente num nível mais baixo, ou que algumas outras enzimas, isto é a NADPH-citocromo P-450 redutase e a xantina oxidase estejam envolvidas na produção de ROS, mas também sugere que as ROS não são de grande importância na actividade sensora de O_2 .

As NOS são uma família de enzimas contendo heme, que catalisam a formação de NO durante a conversão de L-arginina a L-citrulina. Várias isoformas de NOS são expressas em neurónios que inervam o corpo carotídeo e nos seus vasos sanguíneos: NOS-1 neuronal e NOS-3 endotelial (Prabhakar *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Grimes *et al.*, 1995). Pensa-se que o NO endógeno actua como um mensageiro inibitório no corpo carotídeo (Kline *et al.*, 2000), e a diminuição da sua formação pode causar aumento da actividade quimiorreceptora, tal como demonstrado na insuficiência cardíaca crónica (Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). De facto, verificou-se que a hipoxia inibe a actividade da NOS e, correspondentemente, os inibidores da NOS como o éster L-nitro-arginina-metil (L-NAME) aumentam a função sensora basal a nível do corpo carotídeo em normóxia e aumentam a sua resposta à hipoxia, enquanto que a utilização de dadores de NO como a nitroglicerina inibe o corpo carotídeo (Prabhakar *et al.*, 1993; Chugh *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Trzebski *et al.*, 1995; Valdes *et al.*, 2003). A acção inibitória do NO pode simplesmente acontecer pelo seu efeito vasodilatador, dado que a melhoria da oxigenação pode resultar em inibição da descarga quimiossensora. O NO também pode activar a guanilato-ciclase contendo heme e, consequentemente, causar aumento dos níveis celulares de cGMP, levando a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$, e portanto a uma inibição da libertação de neurotransmissores (Snyder, 1992). Outros potenciais mecanismos de acção

envolvem a possível inibição directa dos canais de Ca^{2+} tipo L ou a mobilização de Ca^{2+} dos locais de armazenamento interno, levando a um aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e consequentemente a uma activação dos canais de K^+ dependentes do Ca^{2+} contribuindo para uma hiperpolarização da membrana e diminuição da libertação de transmissores (Prabhakar, 1999; Summers *et al.*, 1999).

A HO é uma enzima ligada à membrana que cliva o heme em CO, biliverdina e ferro, uma reacção que requer oxigénio molecular, e na qual tanto a NADPH como a citocromo P-450 redutase são cofactores essenciais. Até à data foram identificadas duas formas de HO: a proteína HO-1 indutível pelo stress oxidativo e a isoenzima constitutiva HO-2 (Prabhakar, 1999; Maines, 2000). A HO-2 é expressa predominantemente em células neuronais e foi demonstrado existir em células tipo I do corpo carotídeo (Prabhakar *et al.*, 1995a; Prabhakar, 1998). O CO partilha com o NO o mesmo papel principal inibitório, isto é eles são continuamente gerados durante a normóxia para manter a descarga sensitiva baixa, mas durante a hipoxia a diminuição na sua produção vai conduzir a um aumento dessa mesma descarga. O ZN-protoporfirina-9 (ZnPP-9), um inibidor da HO, causa um aumento da actividade sensitiva carotídea, e a administração exógena de CO reverte este efeito (Prabhakar *et al.*, 1995a). Outro inibidor da HO, SnPP-9, aumenta a resposta ventilatória à hipoxia dependente da integridade do NSC, indicando que o efeito da HO é via corpo carotídeo (Kline *et al.*, 2000). Foi demonstrado recentemente que a proteína HO-2 e os canais de K^+ -dependentes de Ca^{2+} (BK_{Ca}) estão co-localizados nas células tipo I, sugerindo que o CO produzido pela HO-2 difunde através dos canais BK_{Ca} vizinhos, mantendo-os abertos durante a normoxia. Correspondentemente, a inibição da produção de CO pela hipoxia vai causar o encerramento dos canais BK_{Ca} e despolarização, conduzindo à entrada de Ca^{2+} pelos canais dependentes de voltagem e neurosecreção (Williams *et al.*, 2004; Kemp, 2005).

1.5.4.3 Proteínas de canais iónicos como sensores de oxigénio (hipótese de membrana)

Esta hipótese baseia-se na evidência crescente de que os níveis de O_2 *per se* podem regular a actividade dos canais iónicos de um modo aparentemente directo e sensitivo. As células tipo I do corpo carotídeo estão equipadas com uma grande variedade de canais iónicos incluindo K^+ , Ca^{2+} e Na^{2+} (Lopez-Barneo *et*

al., 1988), todos eventuais contribuintes na mediação da despolarização rápida em resposta à hipoxia e consequente entrada de Ca^{2+} pelos canais dependentes de voltagem, e portanto secreção de neurotransmissores (Peers, 1997; Lopez-Barneo *et al.*, 1999; Carpenter & Peers, 2001; Lopez-Barneo *et al.*, 2004).

Os canais de K^+ são os mais estudados como canais efectores sensíveis ao O_2 . Os canais de K^+ sensíveis ao O_2 (KO_2) foram primeiramente descritos por Lopez-Barneo e colaboradores nas células tipo I do corpo carotídeo de coelho (Lopez-Barneo *et al.*, 1988). Desde então foram identificadas diferentes classes de canais de K^+ em várias espécies animais e proposto serem de extrema importância na sensibilidade ao O_2 . Estas classes incluem: 1) Canais K_v (Lopez-Barneo *et al.*, 1988; Ganfornina & Lopez-Barneo, 1991; Ganfornina & Lopez-Barneo, 1992a; Ganfornina & Lopez-Barneo, 1992b; Chou & Shirahata, 1996; Sanchez *et al.*, 2002; Lopez-Barneo *et al.*, 2004; Perez-Garcia *et al.*, 2004). 2) Canais BK_{Ca} (Peers, 1990a; Peers, 1990b; Jiang & Haddad, 1994; Wyatt & Peers, 1994; Wyatt *et al.*, 1995; Riesco-Fagundo *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004); 3) Canais de "escape" TASK-like não dependentes da voltagem (Buckler, 1997; Buckler, 1999; Buckler *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004); 4) Canais humanos "retificadores do meio interno" (HERG)-like não dependentes da voltagem (Overholt *et al.*, 2000a; Overholt *et al.*, 2000b; Osanai *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Juntamente com os canais de potássio modulados pela hipoxia, as células tipo I têm um número de correntes de potássio não sensíveis ao oxigénio que são activados pela despolarização e aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Duchen *et al.*, 1988; Biscoe & Duchen, 1990a; Ganfornina & Lopez-Barneo, 1992b).

O mecanismo exacto através do qual a hipoxia altera a actividade dos canais de potássio ainda não se encontra definido, e é actualmente uma área de interesse *major* na actual investigação dos quimiorreceptores arteriais, apesar de ser reconhecido que os canais são espécie dependentes e podem coexistir diferentes classes (Peers, 1997).

A crítica ao papel dos canais K_v e BK_{Ca} na sensibilidade ao O_2 surgiu da demonstração que a utilização de bloqueadores standard de canais de K^+ (tetraetilamonium, TEA; 4-aminopiridina, 4-AP; ou caribdotoxina, ChTX) não conduziu à despolarização das células tipo I, nem causou elevação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ou

descargas a nível do NSC (Cheng & Donnelly, 1995; Pepper *et al.*, 1995; Donnelly, 1995b; Buckler, 1997; Osanai *et al.*, 1997). Adicionalmente, os níveis de PO_2 nos quais a probabilidade de abertura dos canais K_v pode ser afectada variam entre 150 e 90 mmHg, diferindo do nível de PO_2 que estimula a descarga do NSC, isto é < 70 mmHg (Lopez-Lopez *et al.*, 1989; Ganfornina & Lopez-Barneo, 1991; Lahiri *et al.*, 1993; Lahiri *et al.*, 1994; Pepper *et al.*, 1995; Haddad & Jiang, 1997). Outro conhecimento essencial seria saber se os canais são intrinsecamente sensíveis ao O_2 , por exemplo verificar se o efeito hipóxico é preservado em extractos de membrana (Ganfornina & Lopez-Barneo, 1991), ou se eles necessitam de um mediador sensível ao O_2 , isto é alguma alteração do metabolismo celular que module a actividade dos canais (Vega-Saenz de & Rudy, 1992; Williams *et al.*, 2004), ou se uma proteína heme do plasmalema regula a actividade dos canais (Ganfornina & Lopez-Barneo, 1991; Lopez-Lopez & Gonzalez, 1992; Williams *et al.*, 2004). De facto, a demonstração recente de uma interacção entre a proteína contendo heme HO-2 e o canal iónico sensível ao O_2 BK_{Ca} (Williams *et al.*, 2004; Kemp, 2005), sugere que é necessário uma contribuição de ambos, e tem sido proposto que o processo de quimiotransdução possa envolver um conjunto de diferentes sensores de O_2 , funcionando como um “quimosoma”, operando através de uma grande margem de valores de PO_2 (Prabhakar, 2006).

Encontra-se bem estabelecido que o influxo de Ca^{2+} é essencial para a elevação do $[Ca^{2+}]_i$ que antecede a neurosecreção. Múltiplos tipos de correntes de Ca^{2+} dependentes de voltagem, nomeadamente dos tipos L, N, P/Q e R têm sido demonstrados nas células tipo I do rato e coelho, e foi proposto estarem ligados à neurosecreção mediada por estímulos (Obeso *et al.*, 1992; Fieber & McCleskey, 1993; Overholt & Prabhakar, 1997; Rocher *et al.*, 1999; Rocher *et al.*, 2005). Apesar de não haver um significado claro para o papel do Ca^{2+} na sensibilidade à hipoxia, parece que a modalidade e intensidade do estímulo podem afectar as correntes de Ca^{2+} , isto é a hipoxia e a hipercapnia actuariam de modo aditivo no aumento das correntes de Ca^{2+} (Dasso *et al.*, 2000; Summers *et al.*, 2000; Summers *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que os neurotransmissores endógenos como a dopamina e a NA interferem nas correntes de Ca^{2+} das células tipo I (Benot & Lopez-Barneo, 1990; Overholt & Prabhakar, 1999).

Demonstrando a sua presença no corpo carotídeo, a activação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem pela veratridina conduz a uma marcada secreção de dopamina, um efeito que foi completamente bloqueado pela tetrodoxina-TTX (Rocher *et al.*, 1988). Foi sugerido que os canais de Na^+ durante a hipoxia actuariam como meio de amplificar a despolarização inicial causada pela inibição dos canais K_{O_2} (Rocher *et al.*, 1994a; Rocher *et al.*, 1994b). Demonstrou-se recentemente que os neurónios do gânglio petroso do rato expressam múltiplas isoformas do canal de Na^+ , mas os neurónios aferentes do quimiorreceptor, ao contrário dos aferentes do barorreceptor, expressam maioritariamente correntes TTX sensíveis, o que pode sugerir uma ligação entre a quimiorrecepção e as características dos canais de Na^+ (Cummins *et al.*, 2002).

Em células tipo I de rato e gato foi demonstrada a presença de canais de Cl^- de ampla condutância, permeáveis ao bicarbonato, sendo proposto um provável papel na regulação do pH, e no potencial de membrana em repouso (Stea & Nurse, 1989; Stea & Nurse, 1991; Shirahata & Sham, 1999). A inibição destes canais pelo ácido carboxílico antraceno-9 atrasa o início e reduz a magnitude da resposta quimiossensora à hipoxia, sugerindo um possível envolvimento na modulação da quimiotransdução hipóxica (Iturriaga *et al.*, 1998; Panisello & Donnelly, 1998). Contudo, o efeito da hipoxia nestas correntes ainda não foi descrita.

1.5.4.4 Hipótese da quimiotransdução acídica por troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

A bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, a qual cataliza a troca electrogénica bilateral de Na^+ por Ca^{2+} através da membrana plasmática, é dos reguladores *major* do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Blaustein & Lederer, 1999). A sua presença foi demonstrada nas células tipo I de coelho e rato (Biscoe *et al.*, 1989; Buckler *et al.*, 1991a). De acordo com a hipótese da bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o excesso de ácido promove os mecanismos de efluxo de Na^+ -acoplado ao H^+ , causando um aumento da $[\text{Na}^+]_i$, o qual vai promover a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, conduzindo a um aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e à neurosecreção (Rocher *et al.*, 1991). Contudo, estes mesmos autores posteriormente refutam a sua hipótese reportando que a acidose hipercápnica despolariza as células tipo I do corpo carotídeo de coelho através da activação de canais de cálcio tipo L e P/Q (Rocher *et al.*, 2005). De facto, acredita-se que o papel da bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na

homeostase do $[Ca^{2+}]_i$ do corpo carotídeo seja de menor importância (Peers & Buckler, 1995).

1.5.4.5 Hipótese de membrana da quimiotransdução acídica

É mais provável que a quimiotransdução acídica seja acompanhada por mecanismos de membrana, a qual é a contemplada na hipótese de membrana da sensibilidade à hipoxia (Peers & Buckler, 1995). Por isso, a acidose intracelular provocada pela inibição dos canais de K^+ despolariza a membrana das células tipo I, conduzindo a uma entrada de Ca^{2+} dependente de voltagem e consequente libertação de neurotransmissores (Peers, 1990a; Peers & Green, 1991; Stea & Nurse, 1991; Lahiri & Forster, 2003). De facto, tem sido demonstrado que as correntes de K^+ em células individuais tipo I podem ser inibidas tanto pela hipoxia como pela acidose intracelular (Hatton *et al.*, 1997). A $[Ca^{2+}]_i$ e as respostas quimiossensoras à hipercapnia/acidose foram inibidas pelo bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, e esta hipótese foi apoiada por estudos electrofisiológicos revelando despolarização da membrana das células quimiorreceptoras durante a estimulação (Roy *et al.*, 1997; Rocher *et al.*, 2005).

1.5.5 Neurotransmissores e neuromoduladores no corpo carotídeo

Acredita-se que a libertação de neurotransmissores seja o passo final do processo de quimiotransdução nas células tipo I do corpo carotídeo e considera-se que este evento é dependente de Ca^{2+} . A estimulação das células tipo I do corpo carotídeo por diferentes estímulos, isto é hipoxia, hipercapnia, cianeto ou $[K^+]_o$ está associada na maioria dos estudos a níveis elevados de $[Ca^{2+}]_i$ (Sato *et al.*, 1991; Buckler & Vaughan-Jones, 1993; Urena *et al.*, 1994; Buckler & Vaughan-Jones, 1994b; Wasicko *et al.*, 1999; Jiang & EYZAGUIRRE, 2004; Carroll *et al.*, 2005). A remoção do Ca^{2+} extracelular (Almaraz *et al.*, 1986; Shaw *et al.*, 1989; Obeso *et al.*, 1992; Pardal & Lopez-Barneo, 2002) ou o bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Fidone & Gonzalez, 1982; Shaw *et al.*, 1989; Donnelly, 1993; Rocher *et al.*, 2005) inibie a secreção de neurotransmissores.

Vários neurotransmissores, neuromoduladores e receptores foram demonstrados no corpo carotídeo, mas os mecanismos exactos através dos quais eles

funcionam não se encontram totalmente esclarecidos. Os neurotransmissores e neuromoduladores libertados activam receptores específicos localizados nas próprias células tipo I (pré-sinápticos), nas terminações vizinhas aferentes do NSC (pós-sinápticos), ou ambas. Portanto, a actividade das células quimiorreceptoras pode ser modulada por auto-regulação e possivelmente por neurotransmissores libertados pelas terminações nervosas motoras e sensitivas (Iturriaga & Alcajaga, 2004; Jiang & Eyzaguirre, 2004; Nurse, 2005; Bairam & Carroll, 2005).

1.5.5.1 Neurotransmissão adrenérgica

A dopamina é o neurotransmissor mais abundante nas células tipo I, e a sua libertação é frequentemente usada como indicador da neurosecreção (Fidone *et al.*, 1982; Gonzalez *et al.*, 1994). Outras estruturas do corpo carotídeo, por exemplo fibras nervosas sensitivas e autonómicas também expressam tirosina-hidroxilase (TH), a enzima limitadora da velocidade da síntese de dopamina (Wang *et al.*, 1992; Lahiri *et al.*, 2006). Alguns autores consideraram a dopamina como tendo um efeito excitatório, dado que estímulos naturais como a hipoxia ou a acidose estão associados a um aumento da secreção de dopamina (Fidone & Gonzalez, 1982; Rigual *et al.*, 1984; Rigual *et al.*, 1986; Shaw *et al.*, 1989; Urena *et al.*, 1994). Contudo, esta classificação não foi universalmente aceite: por exemplo, o aumento da descarga do NSC induzida pela hipoxia não foi afectado pela depleção do corpo carotídeo em dopamina provocada pela reserpina (Donnelly, 1995a; Donnelly, 1996; Iturriaga *et al.*, 1996). De facto, descobriu-se que a participação da dopamina endógena na actividade quimiossensora aferente e as acções da dopamina aplicada exogenamente não são consistentes nos vários estudos. Estes efeitos variam desde a inibição, na maioria dos estudos, à excitação ou efeito bifásico no qual a inibição é seguida por excitação (Zapata, 1975; Zapata, 1977; Nishino & Lahiri, 1981; Leitner & Roumy, 1985; Iturriaga & Alcajaga, 2004). O corrente consenso geral é que a dopamina é um neurotransmissor inibitório, e a sua acção parece ser um efeito autócrino-parácrino modulador pré-sináptico, actuando via receptores D₂ das células tipo I, inibindo as correntes de Ca²⁺ (Benot & Lopez-Barneo, 1990; Carroll *et al.*, 2005). Contudo, foi sugerida uma acção bifásica da dopamina no corpo carotídeo de cabra, no qual o componente excitatório é produzido pela estimulação cruzada

pós-sináptica de receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados nas terminações nervosas (Herman *et al.*, 2003).

A NA é a outra importante catecolamina armazenada no corpo carotídeo, não havendo dados convincentes que evidenciem o armazenamento de adrenalina (Lahiri *et al.*, 2006). Em níveis fisiológicos, a NA pode funcionar como neurotransmissor inibitório, tal como a dopamina (Kou *et al.*, 1991). Este efeito é mediado pelos adrenoreceptores- α_2 e está ligado à inibição de correntes de Ca²⁺ dependentes da voltagem (Kou *et al.*, 1991; Overholt & Prabhakar, 1999). A NA em concentrações fisiológicas, *in vitro*, está associada a efeitos excitatórios que são atribuídos a uma provável vasoconstrição a nível do corpo carotídeo mediada por adrenoreceptores- β (Rigual *et al.*, 1986). Dado haver uma associação entre a síndrome da morte súbita da criança e um conteúdo mais elevado em catecolaminas endógenas, isto é os níveis encontrados de dopamina são 10 vezes e os de NA são 3 vezes superiores comparando com as crianças controlo, é sugerido que estes neurotransmissores possam ter um significado etiológico naquela síndrome por comprometerem o normal funcionamento do corpo carotídeo (Perrin *et al.*, 1984; Kinney, 2005).

1.5.5.2 Neurotransmissão colinérgica

A ACh é um neurotransmissor excitatório do corpo carotídeo (Eyzaguirre & Koyano, 1965; Fitzgerald & Shirahata, 1994). Apesar da controvérsia acerca da capacidade das células tipo I em sintetizar e libertar ACh (Gauda *et al.*, 2004), foi demonstrada a expressão nestas células das enzimas associadas com a sua síntese – colina-acetiltransferase (ChAT) –, e degradação – acetilcolinesterase (AChE) –, bem como o marcador do transportador vesicular de ACh – VACHT (Nurse, 1987; Nurse & Zhang, 1999; Fitzgerald, 2000; Zhang & Nurse, 2004). A libertação de ACh, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foi demonstrada durante a hipoxia, hipercapnia e acidose (Fitzgerald *et al.*, 1999; Fitzgerald, 2000; Kim *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2006). O bloqueio de ambos os receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh não abole completamente a resposta do corpo carotídeo aos estímulos naturais (Fitzgerald, 2000), portanto a co-libertação de outro transmissor juntamente com a ACh, nomeadamente o ATP, foi proposta como um mecanismo plausível na base da quimiotransdução excitatória em resposta à hipoxia e hipercapnia no rato e no

gato (Varas *et al.*, 2003;Zhang & Nurse, 2004;Nurse, 2005). Num estudo recente, a hipoxia, ao contrário da hipercapnia, e a $[K^+]_o$ elevada surpreendentemente causaram uma inibição da libertação de ACh do corpo carotídeo de coelho, provavelmente via activação de receptores auto-inibitórios muscarínicos e dopaminérgicos a nível das células tipo I (Kim *et al.*, 2004).

1.5.5.3 Neurotransmissão purinérgica

Acredita-se que os transmissores purinérgicos, adenosina e ATP, e os seus receptores purinérgicos, classes P1 e P2 respectivamente, desempenhem papéis chave na quimiotransdução hipóxica e hiperkápnica, bem como na interacção O_2 - CO_2 no corpo carotídeo (JARISCH *et al.*, 1952;Bock, 1980;Spergel & Lahiri, 1993;McQueen *et al.*, 1998;Vandier *et al.*, 1999;Kobayashi *et al.*, 2000;Kumar *et al.*, 2000b;Rong *et al.*, 2003;Spyer *et al.*, 2004;Gourine, 2005). A adenosine, que pode ser produzida a partir do catabolismo do ATP, tem um efeito excitatório na actividade quimiosensora do corpo carotídeo (McQueen & Ribeiro, 1981b;Runold *et al.*, 1990). A libertação de adenosina aumenta durante a hipoxia e pode actuar em auto-receptores A_{2a} de adenosina nas células tipo I, contribuindo para a quimio-excitação (McQueen & Ribeiro, 1986;Conde & Monteiro, 2004). Foi demonstrado que este mecanismo utiliza a inibição de correntes de K^+ dependentes de voltagem nas células tipo I (Vandier *et al.*, 1999). Recentemente, foi sugerido que a adenosina pode inibir canais de K^+ TASK-like via receptores A_{2A} acoplados a adenilato-ciclase e proteína-cinase A (Xu *et al.*, 2006). Tal como mencionado acima, acredita-se que o ATP seja um co-transmissor pós-sináptico *major* da quimo-excitação (Varas *et al.*, 2003;Zhang & Nurse, 2004;Nurse, 2005). Foi demonstrado que o ATP libertado durante a hipoxia pelas células tipo I activa as terminações do NSC via receptores purinérgicos P2X (Rong *et al.*, 2003). Adicionalmente, encontramos trabalhos sugerindo que o ATP pode actuar pré-sinápticamente, influenciando os níveis de $[Ca^{2+}]_i$ nas células tipo I e/ou nas células tipo II adjacentes, possivelmente via receptores purinérgicos P2Y (Xu *et al.*, 2003;Mokashi *et al.*, 2003), o que apoia a hipótese que as células tipo II possam contribuir para a regulação autócrino-parácrina dentro do corpo carotídeo. Fidone e colaboradores demonstraram em estudos recentes, imunocitoquímicos e farmacológicos, que o mecanismo purinérgico, ao contrário do colinérgico, pode desempenhar um papel

importante na adaptação do corpo carotídeo à hipoxia crónica (He *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006).

1.5.5.4 Outros neurotransmissores e neuromoduladores

Foram localizados outros neurotransmissores e neuromoduladores no corpo carotídeo, e demonstrado terem efeitos na “afinação” da função quimiossensora. Estes incluem:

- 5-HT (Chiocchio *et al.*, 1967; Hellstrom & Koslow, 1975; Perrin *et al.*, 1986; Oomori *et al.*, 1994; Zhang & Nurse, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Jacono *et al.*, 2005);
- GABA (Oomori *et al.*, 1994; Oomori *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2006);
- Substância P e outras taquicininas (McQueen, 1980; Prabhakar *et al.*, 1995b; Kumar *et al.*, 2000a; Rigual *et al.*, 2002; Rico *et al.*, 2003; Kumar & Prabhakar, 2003);
- Opióides (Monti-Bloch & Eyzaguirre, 1985; Hanson *et al.*, 1986; Kirby & McQueen, 1986);
- Histamine (Koerner *et al.*, 2004);
- Polipéptido intestinal vasoactivo (Lundberg *et al.*, 1979; McQueen & Ribeiro, 1981a);
- Péptido atrial natriurético (Wang *et al.*, 1991; Fidone *et al.*, 1993; He *et al.*, 2000);
- Endotelinas (Wang *et al.*, 1991; Spyer *et al.*, 1991; Fidone *et al.*, 1993; McQueen *et al.*, 1995; He *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Rey & Iturriaga, 2004; Prabhakar & Jacono, 2005);
- Prostaglandinas (Gomez-Nino *et al.*, 1992; Gomez-Nino *et al.*, 1994a; Gomez-Nino *et al.*, 1994b);
- Melatonina (Kvetnoy, 1999; Tjong *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Tjong *et al.*, 2006);
- Adrenomedulina (Porzionato *et al.*, 2006).

1.5.5.5 Os reflexos do corpo carotídeo

A estimulação do corpo carotídeo provoca um conjunto de reflexos que são sequenciados de acordo com a intensidade do estímulo. Desde os estudos iniciais de perfusão cruzada de Heymans para testar os efeitos da hipoxia, hipercapnia e

acidose na ventilação (Heymans & Bouckaert, 1930), a hiperventilação foi reconhecida como o reflexo mais significativo iniciado pela estimulação do corpo carotídeo. Durante a estimulação do corpo carotídeo, e simultaneamente com a hiperventilação, foram demonstradas respostas cardiovasculares variáveis, dependendo da espécie animal (Heymans & Bouckaert, 1930; Marshall, 1994). Tem sido defendido que a diversidade das espécies não é a causa de tal variabilidade, mas antes uma consequência resultante de outros reflexos e efeitos humorais secundários à estimulação do corpo carotídeo (Marshall, 1994). Portanto, as respostas cardiovasculares à estimulação do corpo carotídeo são divididas em primárias e secundárias. A activação inicial dos neurónios simpáticos e parasimpáticos pelo impulso do quimiorreceptor causa as respostas primárias, nomeadamente bradicardia, diminuição do débito cardíaco, diminuição do volume de ejeção e vasoconstrição periférica. As repostas secundárias, incluindo taquicardia e vasodilatação periférica, podem ocorrer devido à activação neuronal resultante da hiperventilação simultânea, da activação de barorreceptores e/ou da alteração dos gases sanguíneos arteriais, isto é hipocapnia (Marshall, 1987; Somers *et al.*, 1989; Somers *et al.*, 1991; Marshall, 1994; Franchini *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado que o grau de modulação levada a cabo pela hiperventilação é variável, sendo mais significativo se o aumento da ventilação for de mais de 200% em relação à linha de base (De Daly & Scott, 1958; Marshall & Metcalfe, 1988). Também, em animais anestesiados, o uso de anestésico pode influenciar estas respostas, isto é o barbitúrico pode prevenir a activação de áreas de defesa, enquanto o anestésico esteróide altesina (alfaxalona-alfadalona acetato) permite que sejam predominantes os componentes autonómicos do estado de alerta da resposta de defesa, incluindo taquicardia, vasoconstrição mesentérica e renal, e vasodilatação do músculo esquelético (Hilton, 1982; Hilton & Marshall, 1982). Os reflexos iniciados pela estimulação do corpo carotídeo também podem incluir outros efeitos simpático-excitatórios, isto é aumento da actividade nervosa simpática renal e actividade nervosa simpática muscular (Wallin & Fagius, 1988; van den Aardweg & Karemaker, 1992; Hardy *et al.*, 1994; Narkiewicz *et al.*, 1998; Timmers *et al.*, 2003a; Timmers *et al.*, 2003b), aumento da actividade do eixo hipófiso-adrenocortical (Ou & Tenney, 1979; Critchley *et al.*, 1982; Raff *et al.*, 1983; Raff &

Fagin, 1984), e aumento da secreção de catecolaminas pela medula supra-renal (McQueen & Ungar, 1971; Critchley *et al.*, 1980). Muito interessante tem sido a proposta de que a estimulação do corpo carotídeo possa conduzir a um aumento da resposta dos neurónios somatossensoriais para os seus impulsos fisiológicos normais, um efeito que pode ter grande importância sob condições próximas da anoxia cerebral (Angel & Harris, 1998). Acredita-se que algumas formas de doença, tais como a doença obstrutiva do sono, a insuficiência cardíaca congestiva e a hipertensão arterial estejam associadas a um aumento dos reflexos dos quimiorreceptores carotídeos (Daly *et al.*, 1979; Izdebska *et al.*, 1982; Fukuda *et al.*, 1987; Narkiewicz *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999a; Sun *et al.*, 1999b; Kara *et al.*, 2003; Ciarka *et al.*, 2006).

1.5.6 Interacções dos quimoestímulos: O corpo carotídeo como um quimiorreceptor polimodal

As células quimiorreceptoras são sensíveis a múltiplos estímulos, e a interacção entre estes estímulos, quando aplicados simultaneamente, pode produzir mais do que efeitos meramente aditivos (Paterson *et al.*, 1992; Peers, 2004). Tomando como exemplo a interacção O₂-CO₂, a magnitude da resposta do quimiorreceptor a uma dada alteração na PaO₂ é influenciada pelo nível simultâneo da PaCO₂ e vice-versa, havendo uma interacção multiplicativa entre hipoxia e hipercapnia a nível do corpo carotídeo, e portanto a resposta simultânea aos dois estímulos excede o resultado da soma dos seus efeitos individuais. Este facto foi pela primeira vez demonstrado a nível ventilatório no homem por Nielsen & Smith (Nielsen & Smith, 1952), e posteriormente vários grupos de investigação estudaram-no em animais de laboratório (Nielsen & Smith, 1952; Hornbein *et al.*, 1961; Eyzaguirre & Lewin, 1961a; Fitzgerald & Parks, 1971). Contudo, a primeira demonstração desta interacção a nível de fibra única quimioaférente no NSC foi alcançada, *in vivo*, por Lahiri e DeLaney (Lahiri & DeLaney, 1975), e posteriormente revelado, *in vitro*, ser uma propriedade intrínseca do corpo carotídeo (Kholwadwala & Donnelly, 1992; Pepper *et al.*, 1995). Muitos estudos têm sido realizados para tentar elucidar o local e o mecanismo desta interacção, mas ainda não se encontram perfeitamente esclarecidos. Alguns autores apontam para que a interacção se dê a nível da descarga do NSC sem aumento da [Ca²⁺]_i (Bamford *et al.*, 1999), enquanto que outros sugerem que ela ocorra

ao nível das correntes de Ca^{2+} e resposta da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Dasso *et al.*, 2000; Summers *et al.*, 2002). Foi até proposto que esta interacção poderia ter lugar a um nível para lá da célula tipo I (Roy *et al.*, 2000b). Esta opinião baseou-se, em parte, na descoberta de que a corrente de K^+ clássica não aumentava durante os estímulos conjuntos, e esta interacção poderia tomar lugar num local a montante da corrente de K^+ , mas não necessariamente fora da célula tipo I. Foi demonstrado que a interacção O_2 - CO_2 no rato adulto registada a nível das descargas do NSC era significativamente mais elevada do que as registadas no período neo-natal (Carroll *et al.*, 1993; Pepper *et al.*, 1995; Bamford *et al.*, 1999). A sensibilidade do corpo carotídeo ao O_2 torna-se mais marcado após os dias ou semanas iniciais de vida (Eden & Hanson, 1987; Williams *et al.*, 1991; Canet *et al.*, 1996; Wasicko *et al.*, 1999), mas permanecem pouco esclarecidos os mecanismos desta maturação pós-natal (*resetting*). De facto, a maturação pós-natal da sensibilidade do corpo carotídeo pode ocorrer a qualquer nível dos eventos da quimiotransdução: expressão dos canais de K^+ , canais de K^+ e Ca^{2+} sensíveis ao O_2 , despolarização celular, resposta da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, secreção de neurotransmissores, função dos neuromoduladores e expressão dos receptores dos neurotransmissores (Carroll & Kim, 2005).

Para concluir este capítulo sobre O CORPO CAROTÍDEO é importante salientar que a grande gama de estímulos sanguíneos aos quais as células tipo I podem responder e o perfil da interacção ou potenciação entre as diferentes modalidades de estímulos, faz com que este órgão receptor de *stress* polimodal tenha de estar equipado com a capacidade de integrar toda esta extensa informação sensorial que contribui para o estado metabólico geral (Nurse, 2005). Esta integração dos vários sinais parece influenciar a subsequente activação dos sistemas respiratório e cardiovascular e definir, como Heymans descreveu na sua *lecture* do Prémio Nobel, “*a closer functional correlation between the blood circulation, the metabolism, and the pulmonary respiratory exchanges*”.

1.6 ENVELHECIMENTO

1.6.1 Introdução

A idade é uma consequência inevitável da vida. Desde há séculos que as pessoas têm tentado encontrar um remédio miraculoso para evitar ou retardar o

envelhecimento: um exemplo foi a pedra filosofal (*Lapis Philosophorum*) através da qual se poderia obter o “elixir da longa vida”.

Apesar da idade ter vindo a ser considerada uma das principais causas de crise para a economia global e para os serviços de saúde, deve ser reconhecido que a capacidade potencial para uma saúde excelente no idoso permitiu à população mais velha contribuir positivamente para a sociedade (Kalache & Keller, 2000)

O estudo das alterações da idade em organismos complexos é uma das áreas mais difíceis e desafiadoras da investigação biológica.

Há sempre um murmúrio de expectativa e curiosidade quando a discussão envolve o tema dos supercentenários. Até à data, o ser humano com o certificado de vida mais longa é a *Madame* Jeanne Calment que, na data da sua morte em Agosto de 1997, tinha 122 anos e 164 dias, de acordo com o *Guinness World Book of Records* (Coles, 2005).

A esperança média de vida (EMV) é representada pela idade a que sobrevive 50% de uma dada população, e potencial de vida máxima (PVM) representa a idade do membro mais idoso de uma população ou espécie.

Os factos históricos da Antiguidade revelam uma sobrevida relativamente curta, estimada em 28 a 42 anos na Itália pré-Romana, e o seu aumento foi muito lento (Capasso *et al.*, 2003). Contudo, tal como é dado ênfase em estudos recentes, uma análise da EMV de 1840 até ao presente revela um aumento linear de quase 3 meses por ano, tendo atingido, pelo menos para as mulheres, os 85 anos. A EMV dos homens também aumentou, mas a um menor ritmo, determinando um aumento lento do intervalo ligado ao género (Oeppen & Vaupel, 2002). Claramente, o conceito de EMV é diferente da idade máxima atingida na altura da morte, a qual se tem mantido constante e estabelecida nos 90-100 anos, e o caso de Jeanne Calment levanta uma questão muito importante para a qual não existe ainda uma resposta de consenso: ela é uma excepção, sendo um exemplo vivo da sobrevida máxima do ser humano (Carnes *et al.*, 2003), ou é apenas a pioneira na estrada da expansão da EMV, tal como é defendido por gerontologistas como Vaupel e Carey (Vaupel *et al.*, 1998). Algumas estimativas biodemográficas prevêem que a eliminação da maioria das causas *major* de morte como o cancro, as doenças cardiovasculares e a diabetes

não adicionaria mais do que 10 anos à EMV, e não afectaria a PVM (Troen, 2003).

O envelhecimento é caracterizado por um declínio gradual da reserva funcional dos órgãos, ficando reduzida a capacidade para manter a homeostase, especialmente sob condições de stress (Troen, 2003; Toescu, 2005). Pensa-se que em muitos sistemas a perda de função se inicia aos 30-40 anos de idade, progredindo 1% anualmente. Apesar deste processo parecer contínuo e irreversível, a idade em si não é sinónimo de patologia: não obstante a exposição a toda esta evolução, muitos idosos ultrapassam-na muito bem, mantendo uma notável função fisiológica periférica e central, nomeadamente cognitiva (Toescu, 2005).

Os centenários, sendo um modelo humano de atraso no aparecimento das doenças ou até ausência de doenças, parecem ser um grupo de estudo ideal para traçar o fenómeno genético particularmente associado ao favorecimento da sobrevida, e de facto é caracterizado por uma maior eficácia na reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou na eliminação de células aberrantes. Actualmente estima-se em 200 000 o número de centenários em todo o mundo, e nos países altamente industrializados o número de centenários aumenta a um razão de 8% por ano (Zietkiewicz *et al.*, 2009).

É difícil responder à questão sobre qual é a idade a partir da qual deveremos ser chamados idosos. Por razões práticas, tomou-se como critério os 65 anos de idade. Contudo, é necessário enfatizar que a idade denunciada pelo calendário não é um indicador perfeito para o envelhecimento. Do ponto de vista clínico, o mais provável é que dois indivíduos da mesma idade difiram mais entre si quando idosos do que noutra qualquer etapa da vida. Isto é devido à sua condição física estar relacionada não só com a idade, mas também com o seu *status* social e – importantíssimo – a presença de doenças crónicas.

Têm sido associadas três variáveis ao aumento da EMV: diminuir a temperatura ambiente, manter uma actividade física regular (Sohal & Weindruch, 1996), e a restrição calórica sem malnutrição, esta última aparentemente também aumentando o PVM (Weindruch & Walford, 1982; Yu *et al.*, 1985). No entanto há autores que levantam algumas dúvidas, sugerindo cautela relativamente à

restrição calórica nos humanos (Demetrius, 2004; Dirks & Leeuwenburgh, 2006; Kitani, 2007), dizendo serem os seus efeitos negligenciáveis.

pouca explicação sobre as alterações do funcionamento de órgão específicos. Globalmente, os estudos de restrição calórica, de diminuição do *stress* oxidativo e de EMV têm dado relacionadas com a idade, e pouco se conhece sobre a vulnerabilidade de um processo fisiológico particular com o avançar da idade.

Por vezes é difícil separar a realidade do desejo, especialmente nos processos multifactoriais como o envelhecimento. Como resultado, toma lugar uma constante mudança de paradigmas. O envelhecimento normal do cérebro, por exemplo, não é como se pensava previamente e de forma dogmática, associado ou explicado por uma diminuição do número de neurónios (Morrison & Hof, 1997b): poucas regiões do cérebro revelam perdas neuronais significativas (Hof & Morrison, 2004).

Os factores adversos que causam o envelhecimento, tanto genéticos como ambientais, actuam primariamente a nível celular, mais do que a nível do organismo. Existem muitos estudos associando a idade avançada e sintomas celulares, tais como a alteração da morfologia das células, diminuição da capacidade proliferativa, desregulação dos mecanismos de reparação e apoptose, perda da estabilidade genómica, alterações na expressão dos genes e declínio da função das proteínas (De Magalhaes, 2004). Contudo, muitos destes fenómenos estão envolvidos em ciclos viciosos, podendo ser considerados tanto a causa como a manifestação da deterioração celular. Além de que a relação de causalidade entre o envelhecimento celular e o envelhecimento de um organismo multicelular é complicada, e está longe de se encontrar completamente esclarecida (Patil *et al.*, 2005).

Durante toda a vida, uma variedade de reacções adversas causam lesão no DNA; estas incluem a exposição a factores agressores exógenos (raios UV, radiação ionizante, fármacos genotóxicos) e endógenos como o *stress* oxidativo e os erros de replicação ou recombinação (Zietkiewicz *et al.*, 2009). Para manter a sua capacidade de agir e responder de modo adequado, as células têm de proteger a sua informação genética dos ataques constantes internos e externos de agentes agressores. As vias de reparação do DNA e da sinalização da lesão do DNA são os factores *major* a determinar o destino celular. As poli(ADP-ribose)polimerases

(PARPs) catalisam a modificação pós-translacional de proteínas com poli(ADP-ribose). As PARPs e o seu produto poli(ADP-ribose) estão envolvidos na modulação da reparação do DNA, na regulação da estrutura de cromatina, na regulação da transcrição, na organização do fuso mitótico, na manutenção do telómero, na regulação do *trafficking*, nas multi-resistências a fármacos e na activação da morte celular. As investigações recentes sobre PARPs e poli(ADP-ribose) fizeram aparecer diversos mecanismos ligando a actividade PARP ao envelhecimento nos mamíferos. Distúrbios em qualquer das vias referidas onde estão implicadas as PARPs podem conduzir a senescência ou morte celular, portanto diminuindo a funcionalidade do órgão envolvido (Beneke & Burkle, 2007).

Contudo, há um conjunto crescente de evidências de que algumas funções fisiológicas estão bem preservadas ao longo da idade.

1.6.2 O que realmente se deteriora com a idade?

Para correlacionar as alterações dependentes da idade em muitas das funções fisiológicas e comportamentais, numerosos estudos têm examinado as modificações nas actividades de vários neurotransmissores e enzimas ao longo do envelhecimento.

O envelhecimento normal dos neurónios do sistema autonómico periférico é um processo subtil e complexo que não resulta sempre numa deterioração dramática (Duckles *et al.*, 1985; Buchholz *et al.*, 1992b; Pottorf *et al.*, 2002; Troen, 2003; Buchholz *et al.*, 2007).

Um estudo usando o rato como modelo, indica que nem o índice de densidade nervosa adrenérgica, nem a sensibilidade dos receptores adrenérgicos à NA se modifica com a idade (Duckles *et al.*, 1985; Hajduczuk *et al.*, 1991a).

A função dos barorreflexos carotídeos e cardiopulmonares mantem-se ao longo da idade em ratos (Wei *et al.*, 1986) e em humanos (Shi *et al.*, 1996). Contudo, alguns estudos em cães (Hajduczuk *et al.*, 1991b) e humanos (Gribbin *et al.*, 1971) demonstram a sua deterioração com a idade.

Estudos usando medidas directas do *uptake* de ^3H -NA demonstram que a função dos transportadores de NA não se altera com a idade nos nervos adrenérgicos periféricos (Duckles *et al.*, 1985).

Por exemplo, o gânglio cervical superior (GCS) é uma fonte de impulsos adrenérgicos para uma grande variedade de tecidos, e a manutenção do número de neurónios no GCS, necessária para a função adequada dos órgãos alvo inervados pelo GCS, é dependente de factores tróficos como o factor de crescimento do nervo (NGF). Apesar dos níveis de NGF diminuírem com a idade, a resposta trófica dos nervos simpáticos perivasculares ao NGF é preservada (Isaacson & Crutcher, 1998; Dickason & Isaacson, 2002). Globalmente, a evidência em termos do normal envelhecimento demonstra que os neurónios periféricos esforçam-se por manter a homeostase e conseguem responder às influências tróficas muito tarde na vida (Cowen & Gavazzi, 1998).

Usando como modelo a artéria carótida interna e a artéria cerebral anterior, tanto o conteúdo em NA como o número de fibras nervosas contendo TH diminuem com a idade. Contudo, após a infusão de NGF, o conteúdo em NA e o número de neurónios contendo TH aumentam de modo significativo nos animais envelhecidos (Dickason & Isaacson, 2002). Estes estudos sugerem que existe uma capacidade inata relacionada com a idade para manter um número crítico de neurónios simpáticos funcionantes, a qual pode sugerir possibilidades terapêuticas interessantes no sentido de manter a homeostase cardiovascular na idade avançada.

Num estudo longitudinal em humanos saudáveis, nem o débito cardíaco (Rodeheffer *et al.*, 1984), nem a depuração da creatinina (Lindeman *et al.*, 1985) se deterioraram com a idade: apenas se houver morbilidades associadas com a idade é que estas funções diminuem.

A função enzimática de metabolização de fármacos a nível do citocromo P-450 não diminui ao longo da idade em ambos os sexos (Kitani, 2007). Outros estudos demonstram um declínio da actividade enzimática de isoformas específicas, particularmente do CYP3A4, mas também do CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2E1, o que pode explicar o facto da capacidade do fígado do idoso em metabolizar fármacos não diminuir da mesma forma em todas as moléculas; talvez a característica mais assinalável da função hepática no idoso seja um aumento da variabilidade interindividual, um facto que pode tornar pouco claras as diferenças relacionadas com a idade (Perucca, 2007).

A actividade enzimática do glutatião S-transferase, uma importante enzima citosólica, manteve-se inalterada ao longo da idade em ratinhos fêmea (Carrillo *et al.*, 1989).

Em humanos saudáveis, a capacidade de conjugação hepática do paracetamol, analisada pela depuração urinária dos seus conjugados (com valores corrigidos para o volume do fígado), não mostraram diferenças entre os idosos e os jovens (Wynne *et al.*, 1990). Alguns autores consideram que muitas, senão todas as funções do fígado e em especial as actividades enzimáticas, se mantêm inalteradas ao longo da idade, pelo menos enquanto o sujeito se mantiver saudável (Kitani, 2007). No entanto, os mesmos autores descobriram um parâmetro que, de modo consistente, se deteriora com a idade: o coeficiente de difusão proteica lateral através das membranas de superfície dos hepatocitos. Esta descoberta também se revelou verdadeira em células cerebrais e do músculo esquelético. Esta alteração da mobilidade das proteínas nas membranas de superfície das células tem um impacto profundo nas funções fisiológicas destes órgãos, nomeadamente no transporte transmembranar mediado pelas proteínas de membrana de várias substâncias quer endógenas, quer exógenas. É da maior importância tomar consciência que a idade é um fenómeno que ocorre em todo o organismo. Se virmos o funcionamento do organismo como um todo, nós podemos claramente e facilmente demonstrar um definitivo e reprodutível declínio das funções do organismo. Mas se olharmos para a actividade já referida acima do glutatião S-transferase, afinal ela é também um exemplo de um fenómeno que ocorre em todo o organismo. Provavelmente, a integração de todas as funções pode ser o mais importante para manter os animais vivos. É espantoso o pouco que se altera com a idade o funcionamento de um órgão único e vital como o fígado, onde muitos parâmetros bioquímicos se mantêm em níveis idênticos aos dos jovens, mesmo nos animais mais velhos (Kitani, 2007).

1.6.3 Homeostase do cálcio durante o envelhecimento

Acredita-se que a libertação de neurotransmissores seja o passo final do processo de quimiotransdução. O cálcio é amplamente reconhecido como segundo mensageiro universal nas células neuronais, e integra múltiplas funções celulares. Estas incluem a libertação de neurotransmissores, expressão de genes,

proliferação, excitabilidade e regulação da morte celular ou das vias de apoptose (Malenka *et al.*, 1989;Choi, 1992;Berridge, 1995;Clapham, 1995;Ginty, 1997;Berridge, 1998;Wuytack *et al.*, 2002). Neste contexto, os investigadores introduziram a ideia da possibilidade de que o distúrbio da homeostase do Ca^{2+} possa causar diversas situações disfuncionais e/ou patológicas. Distinguem-se as propostas, colectivamente chamadas “hipótese do Ca^{2+} para o envelhecimento”, de que a idade funcional e as patologias relacionadas com a idade possam ser atribuídas a uma ruptura na homeostase do Ca^{2+} (Landfield & Pitler, 1984;Landfield, 1987).

O estado fisiológico dos mecanismos homeostáticos do Ca^{2+} é regido a um nível mais básico pelo influxo de Ca^{2+} , o qual por sua vez é regulado pela inter-relação entre os neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Existe uma evidência considerável de que a alteração na homeostase do Ca^{2+} possa desempenhar um papel no normal envelhecimento do cérebro e na doença de Alzheimer (Landfield & Pitler, 1984), e que um dos aspectos desta alteração na homeostase do Ca^{2+} possa envolver um aumento nos potenciais e canais de Ca^{2+} , particularmente nos de tipo L (Landfield & Pitler, 1984;Porter *et al.*, 1997). E de facto, em culturas de células de hipocampo de rato, o tratamento crónico com nimodipina, um antagonista dos canais de Ca^{2+} tipo L, aumenta a sobrevivência destas células de modo muito significativo (Porter *et al.*, 1997). Tem havido resultados diferentes quanto ao influxo de Ca^{2+} no envelhecimento: aumento ao longo da idade nos neurónios centrais (Landfield & Pitler, 1984;Pitler & Landfield, 1990); diminuição a nível dos neurónios periféricos (Kostyuk *et al.*, 1993); ou sem alteração nos neurónios centrais (Murchison & Griffith, 1996).

Uma questão importante nos estudos sobre envelhecimento é a tendência para assumir uma deterioração geral, relacionada com a idade, do processo de regulação do cálcio conduzindo a um aumento da susceptibilidade à patologia e morte celular (Porter *et al.*, 1997). Este assumir não leva em consideração os mecanismos compensatórios do influxo aumentado de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, e possivelmente através de receptores do glutamato, como o rápido tamponamento do Ca^{2+} , e que servem para regular a homeostase da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mantendo algum grau de função neuronal em neurónios senescentes ou durante patologia aguda, como o acidente vascular cerebral

(Murchison & Griffith, 1998; Lee *et al.*, 1999; Griffith *et al.*, 2000; Pottorf *et al.*, 2002). De facto foi constatado um aumento do tamponamento do Ca^{2+} , na ordem de duas vezes superior, nos neurónios de animais velhos (Murchison & Griffith, 1998).

Alguns estudos indicam que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ não se altera com a idade, mas a amplitude das variações de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocadas pelo K^+ ou por potenciais eléctricos diminui no envelhecimento (Griffith *et al.*, 2000).

As várias alterações da homeostase do Ca^{2+} ao longo da idade, já muito bem documentadas a nível neuronal, sugerem que os mecanismos homeostáticos do Ca^{2+} apresentam uma particular plasticidade, e são apropriados para mediar as respostas compensadoras de modo a manter a função normal no sistema nervoso do idoso (Griffith *et al.*, 2000). Portanto, os mecanismos homeostáticos do Ca^{2+} em neurónios deverão ser alvos importantes para terapêuticas profilácticas e de intervenção, desenhadas para controlar os défices cognitivos associados ao envelhecimento.

1.6.4 Teoria mitocondrial do envelhecimento

O potencial de membrana mitocondrial é o principal parâmetro bioenergético que controla a velocidade respiratória, a síntese de ATP e a geração de ROS, sendo ele próprio controlado pelo transporte electrónico e fuga de prótons (Nicholls, 2004).

A nível celular, uma importante teoria tenta explicar uma variedade de observações experimentais: a teoria mitocondrial do envelhecimento. O papel da mitocôndria foi mencionado inicialmente em 1972 por Harman no contexto da sua teoria dos ROS no envelhecimento (Harman, 1972), mas a teoria mitocondrial do envelhecimento só foi formalmente introduzida em 1980, tendo como ponto central a hipótese de que o envelhecimento é, essencialmente, uma consequência da lesão do DNA mitocondrial por mutação, inactivação ou perda (Miquel *et al.*, 1980). Mesmo agora, após mais de 20 anos, o envelhecimento neuronal normal pode ser visto, do ponto de vista do estado da fisiologia celular, como um estado metabólico caracterizado pelo estado da mitocôndria (Toescu, 2005).

Diversas linhas de investigação demonstram que nos tecidos envelhecidos as mitocôndrias estão cronicamente despolarizadas (Hagen *et al.*, 1997; Harper *et*

al., 1998; Xiong *et al.*, 2002a). Da observação deste facto, podemos inferir certas consequências funcionais: alteração do gradiente de Ca^{2+} através do sistema de membrana mitocondrial, levando quer a uma redução da eficácia do armazenamento de Ca^{2+} , quer a um aumento do limiar necessário para a recaptação mitocondrial de Ca^{2+} (Xiong *et al.*, 2004); alteração da capacidade de produzir ATP, bem como redução da produção de ROS (Nicholls, 2004). A participação do armazenamento mitocondrial de Ca^{2+} pode ser avaliado a dois níveis: (i) os efeitos no aumento das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se seguem a uma estimulação; (ii) a quantidade de Ca^{2+} que vai para o armazenamento mitocondrial. Quando medido em valores da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ acima do limiar mitocondrial para a recaptação de Ca^{2+} , as mitocôndrias diminuem a razão de aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico, um efeito que não se altera com a idade (Toescu & Verkhratsky, 2000; Murchison *et al.*, 2004b). Também o conteúdo e a produção de ATP mitocondriais em condições de repouso não mostraram diferenças entre os ratos adultos e os ratos envelhecidos (Drew & Leeuwenburgh, 2003).

A actividade da tríade Ca^{2+} -mitocôndria-ROS está na base da acumulação de defeitos funcionais ao longo do envelhecimento, portanto da maior vulnerabilidade e susceptibilidade às agressões. Mas é importante saber que, nos neurónios, o aumento da vulnerabilidade associado ao envelhecimento não significa aumento da morte neuronal: não confundir envelhecimento com doença neurodegenerativa. Alguns autores defendem que a doença neurodegenerativa e uma das suas resultantes disfunções, a demência, são inevitáveis, e resultam inexoravelmente da idade avançada (Terry & Katzman, 2001). Contrariando este ponto de vista, outros apontam diferenças morfológicas e funcionais entre o cérebro envelhecido e o afectado por doença neurodegenerativa (Morrison & Hof, 1997a; Morrison, 2001). Outro argumento do domínio da neurofisiologia é a observação, confirmada em cada vez maior número de laboratórios, que os valores da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ não são afectados pela idade (Thibault *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002b; Murchison *et al.*, 2004a). Nos neurónios envelhecidos está mantida a normal actividade metabólica em repouso ou durante níveis moderados de actividade (Toescu *et al.*, 2004).

1.6.5 Função dopaminérgica e purinérgica

O controlo da ventilação é modificado por impulsos que se originam dos quimiorreceptores centrais e periféricos. A dopamina é a catecolamina mais abundante no cérebro e no corpo carotídeo (Chow *et al.*, 1986). Apesar da dopamina ser conhecida por inibir a actividade neuronal aferente do corpo carotídeo, ela estimula a actividade neuronal envolvendo a regulação respiratória central (Hsiao *et al.*, 1989). Portanto, aparentemente a dopamina exerce efeitos contrários na regulação da ventilação: uma acção depressora do V_E a nível dos quimiorreceptores periféricos, e uma acção excitatória do V_E a nível do sistema nervoso central (Zapata & Torrealba, 1984).

A perda de receptores D_2 de dopamina tornou-se numa das alterações mais descritas e reprodutíveis durante o envelhecimento, bem como num biomarcador da idade biológica, e tem sido relacionado com alterações das funções cognitiva e motora (Joseph *et al.*, 1978; Roth & Joseph, 1994b).

A concentração de receptores de dopamina do estriado diminui com a idade numa grande variedade de espécies, incluindo o homem. A diminuição da velocidade de síntese do mRNA codificando para os receptores D_2 de dopamina parece ser responsável pelos níveis de receptores sobreviventes no estriado dos ratos envelhecidos (Roth & Joseph, 1994a).

Fora do SNC, o envelhecimento conduz a uma diminuição marcada nos receptores D_2 de dopamina noutros sistemas, nomeadamente a nível do coração e da parede das coronárias em ratos (Cavallotti *et al.*, 2002b).

As interacções dos receptores adenosina – dopamina desempenham um papel importante, nomeadamente nos gânglios da base. Em particular, os receptores D_2 de dopamina do estriado estão co-localizados com os receptores A_{2A} de adenosina, havendo evidência de um forte antagonismo entre os dois tipos de receptores (Ferre *et al.*, 1997). Alguns resultados indicam que, ao contrário dos receptores D_2 de dopamina, os receptores A_{2A} de adenosina só estão ligeiramente reduzidos no envelhecimento (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1993; Cunha *et al.*, 1995). Neste contexto, foi sugerido que se podia desenvolver uma alteração no balanço entre os receptores A_{2A} e D_2 ao longo da idade (Popoli *et al.*, 1998b).

A acção neuromoduladora da adenosina e a expressão dos seus receptores de membrana também se alteram com a idade. O receptor A_1 de adenosina é menos eficaz nos animais envelhecidos, quer por diminuição do mRNA específico dos receptores A_1 , quer por défices nas vias de transdução de sinal, nomeadamente menor expressão dos receptores A_1 e das proteínas G_i , e diminuição da própria ligação do receptor à proteína G (Bhat *et al.*, 1998; Sebastiao *et al.*, 2000b), ao passo que o funcionamento e o número de receptores A_{2A} de adenosina no hipocampo são maiores nos animais envelhecidos (Lopes *et al.*, 1999b). Também coexistem alterações nas vias de transdução operadas pelos receptores A_{2A} de adenosina facilitando a transmissão sináptica (Rebola *et al.*, 2003), bem como aumento dos níveis de adenosina endógena extracelular ao longo da idade (Cunha *et al.*, 2001).

A acção tónica da adenosina resulta de um balanço entre as acções inibitórias e facilitadoras mediadas respectivamente pelos receptores A_1 e A_{2A} . É sabido que no hipocampo e córtex límbico de rato há uma baixa densidade de receptores A_1 e uma densidade elevada de receptores A_{2A} de adenosina (Cunha *et al.*, 1995). A referida diminuição de receptores A_1 não se observa no estriado (Cunha *et al.*, 1995). Consequentemente, nalgumas regiões, a relação A_1/A_{2A} também se altera com a idade (Cunha *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 1999c).

Estudos no coração de coelhos envelhecidos revelam um aumento na densidade dos receptores A_1 , o que se pode relacionar com o verificado aumento da sensibilidade do coração senescente à acção inotrópica negativa da adenosina (Mudumbi *et al.*, 1995b).

Foi demonstrado um aumento da actividade purinérgica em culturas de fibroblastos humanos ao longo da idade (Ethier *et al.*, 1989).

No hipocampo de rato são necessárias concentrações dez vezes superiores de PIA, um agonista selectivo dos receptores A_1 de adenosina, nos animais envelhecidos para conseguir a mesma supressão na libertação de ACh evocada pelo K^+ relativamente aos animais jovens (Jin *et al.*, 1993), podendo este facto dever-se a uma diminuição da eficácia dos receptores de adenosina consequente ao aumento da actividade purinérgica endógena ao longo da idade (Ethier *et al.*, 1989).

1.6.6 Farmacologia e envelhecimento

A idade é um factor de risco para as doenças crónicas, tornando mais provável que o idoso tenha o diagnóstico e tratamento de múltiplas comorbilidades (Klotz, 1998;McLean & Le Couteur, 2004). A polimedicação, que é definida como o uso de 5 ou mais medicamentos, ocorre em 20 a 40 % desta faixa etária. Dado um aumento do número de fármacos tomado por aqueles com idade superior a 65 anos, também há um aumento na probabilidade de se desenvolverem reacções adversas medicamentosas (Turnheim, 2003). O processo clínico que responde à medicação de um doente individual é uma rede resultante da interacção de um número de processos complexos. Estes processos incluem aqueles afectando a farmacocinética (isto é, a relação entre a dose administrada e a concentração do fármaco na circulação sistémica), e aqueles que afectam a farmacodinâmica (isto é, a acção do fármaco).

Apesar dos vários processos fisiológicos (motilidade, secreções e fluxo sanguíneo gastrointestinais, e superfície de absorção da mucosa) que afectam a absorção dos fármacos possam estar alterados com a idade, a maioria dos fármacos é absorvida adequadamente quando administrada no idoso (Perucca, 2007).

Com a idade, o tecido adiposo aumenta cerca de duas vezes no homem e 50 % na mulher; como resultado, os fármacos lipofílicos e hidrofílicos apresentam respectivamente um maior e um relativamente menor volume de distribuição no idoso (Bernus *et al.*, 1997), o que vai influenciar o tempo de vida média, independentemente da alteração da capacidade de metabolização do fármaco. Por exemplo, o tempo de vida média do diazepam pode aumentar cerca de quatro vezes entre os 20 e os 80 anos, sendo amplamente atribuído ao aumento do volume de distribuição, e não à diminuição na capacidade de metabolização, a qual diminui de modo pouco significativo no idoso (Klotz *et al.*, 1975).

Há uma tendência geral para uma maior sensibilidade farmacodinâmica no idoso; contudo, este facto não é universal, e estas alterações relacionadas com a idade devem ser investigadas caso a caso até que a investigação futura forneça um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares que estão na base do envelhecimento (Buchholz *et al.*, 1992a;Bowie & Slattum, 2007). Por exemplo, está demonstrado que enquanto que a sensibilidade dos receptores A₂ prejunctionais ao antagonista idazoxan diminui com a idade, parece não haver

diferença no idoso à resposta máxima a este fármaco (Buchholz *et al.*, 1992a). Os parâmetros farmacocinéticos, sozinhos, não substituem a necessidade de uma monitorização cuidadosa da resposta clínica, e o ajuste consequente das doses (Buchholz *et al.*, 1992a).

Diante do cenário exposto acima, é importante que uma prescrição adequada para o idoso: a) considere o estado clínico do doente; b) minimize o número de fármacos a serem administrados para evitar interações medicamentosas e maior possibilidade de reações adversas; c) seja iniciada com pequenas doses e ajustada conforme a resposta; d) evite ao máximo o uso de medicamentos considerados inadequados pela literatura médica e científica; e) e em situações em que os mesmos não possam ser evitados, que o seu uso se dê com cautela e monitorização constante. O uso racional de medicamento pelos idosos é fundamental para evitar gastos excessivos com múltiplos medicamentos e evitar eventuais internamentos desnecessários, de modo a desonerar o sistema nacional de saúde e assegurar boa qualidade de vida a estes indivíduos.

1.6.7 Sistema respiratório e a idade

1.6.7.1 Geral

A morfologia e a função do sistema respiratório sofrem alterações ao longo da idade. Têm sido observadas quer em ratos quer em humanos, reduções na capacidade respiratória (Kronenberg & Drage, 1973; Nagase *et al.*, 1994b; Soulage *et al.*, 2004), no fornecimento de oxigénio aos tecidos (Hepple *et al.*, 2003) e na PO_2 arterial (Wiernsperger *et al.*, 1978; Cerveri *et al.*, 1995b; Gunnarsson *et al.*, 1996). Contudo, outros autores consideram que apesar das importantes alterações na estrutura e função que se desenvolvem com a idade, os pulmões são capazes de manter adequadas as trocas gasosas durante toda a vida ao demonstrarem que a PaO_2 não diminui com a idade (Guenard & Marthan, 1996), que a capilaridade anatómica é mantida num excesso de capacidade oxidativa nalgumas regiões musculares dos ratos envelhecidos (Hepple & Vogell, 2004), e as pressões parciais de oxigénio nas colaterais das coronárias de corações jovens ou envelhecidos não apresentam diferenças significativas (Dobson, Jr. *et al.*, 1990).

No humano, para além de dois importantes factores que reduzem a resposta ventilatória à hipercapnia e diminuem muito ou abolem a resposta à hipoxia, nomeadamente a exposição prolongada à hipoxia (Weil *et al.*, 1971) e a condição física (Byrne-Quinn *et al.*, 1971), alguns autores também consideram que as respostas ventilatórias e cardíacas à hipoxia e hipercapnia diminuem com a idade (Kronenberg & Drage, 1973). Existem outros factores, não relacionados com a função quimiorreceptora, que também operam no idoso normal. Sabe-se que se vão instalando alterações na mecânica pulmonar ao longo da idade: perda da elasticidade; aumento da *compliance* pulmonar; diminuição da capacidade de difusão do O₂; encerramento prematuro das vias aéreas conduzindo a um aumento do gradiente de O₂ alvéolo-arterial; encerramento das pequenas vias aéreas com o consequente aumento do volume residual; e diminuição dos fluxos expiratórios. Estas alterações funcionais mimetizam as observadas no enfisema. De facto, estudos de longa duração demonstram que os ratos envelhecidos exibem uma doença pulmonar obstrutiva crónica parecida com o enfisema pulmonar observado nos humanos (Saldiva *et al.*, 1988b).

Também a parede torácica e os músculos respiratórios sofrem alterações estruturais com a idade. O aumento da rigidez da caixa torácica conduz a uma maior contribuição do diafragma e dos músculos abdominais, e menor contribuição dos músculos torácicos para a ventilação (Janssens *et al.*, 1999). Contrastando com a preservação da massa muscular do diafragma ao longo da idade, a partir da V década os músculos expiratórios intercostais e, em menor extensão, os músculos inspiratórios intercostais sofrem respectivamente uma atrofia de 20 e 7 % de área de secção transversal (Chan & Welsh, 1998).

As modificações estruturais das paredes torácica e pulmonar produzem alterações nos testes de função pulmonar no idoso: diminuição progressiva na capacidade vital com um aumento no volume residual, e sem alterações na capacidade pulmonar total. A capacidade residual funcional também aumenta com a idade, mas em menor grau. A diminuição progressiva do volume expiratório forçado no primeiro segundo e da capacidade vital forçada com a idade sugere que, numa população relativamente saudável, as funções espirométricas declinam no idoso (Turner *et al.*, 1968b; Chan & Welsh, 1998). O envelhecimento reduz a pressão inspiratória máxima e a pressão expiratória

máxima, mas esse facto não possui um impacto significativo nas variáveis respiratórias como o V_E , V_T e f_R (Britto *et al.*, 2009).

Apesar das alterações na função mecânica pulmonar contribuírem para a diminuição de algumas das respostas ventilatórias à hipoxia e hipercapnia no idoso normal, parece pouco provável que elas possam explicar inteiramente a referida atenuação da função quimiorreceptora (Kronenberg & Drage, 1973). O mais provável é que as respostas ventilatórias à hipoxia ou hipercapnia estejam atenuadas nos idosos devido à diminuição da quimiosensibilidade periférica, à redução dos impulsos nervosos para os músculos respiratórios, e à diminuição da eficácia mecânica. A combinação hipoxemia hipercápnica resulta num ainda menor aumento da ventilação no idoso relativamente ao jovem, e este facto é devido principalmente a uma diminuição da sensibilidade periférica ao CO_2 (Poulin *et al.*, 1993).

Por outro lado, Brischetto e colaboradores demonstraram que, nos idosos estudados, a resposta ventilatória ao exercício é maior do que a encontrada no grupo controlo de indivíduos jovens (Brischetto *et al.*, 1984).

Os dados sobre o efeito da idade no controlo da ventilação quer periféricamente quer centralmente, são muito escassos. A nível periférico, os corpos carotídeos dos mamíferos são os principais órgãos quimiorreceptores que controlam a ventilação ao serem sensíveis aos níveis de PO_2 , PCO_2 e pH do sangue arterial, iniciando respostas reflexas compensatórias através do aumento da actividade aferente a nível do NSC, resultando em alterações correctivas da ventilação. O efeito específico da idade foi enfatizado tanto nos quimiorreceptores do corpo carotídeo (Di Giulio *et al.*, 2003b; Pokorski *et al.*, 2004; Conde *et al.*, 2006b) como nos quimiorreceptores centrais (Phillipson & Kozar, 1993).

1.6.7.2 Controlo periférico da ventilação

A função do corpo carotídeo na idade avançada é um desafio que permanece por esclarecer, e não obstante ser muito plausível depender da morfologia do corpo carotídeo, também deverá depender da espécie considerada e da sua capacidade de compensar a resposta ventilatória à hipoxia.

No rato anestesiado foram descritas por Fukuda e colaboradores alterações, relacionadas com a idade, das respostas ventilatórias à hipoxia e hipercapnia, evidenciando um paralelo com uma diminuição no consumo de oxigénio

dependente da idade (Fukuda, 1991;Fukuda, 1992): a magnitude do aumento na ventilação (normalizado para o peso corporal) durante a hipoxia em condições de isocapnia diminui com o avanço da idade (Fukuda, 1992); a resposta ventilatória ao aumento da CO_2 também diminui com a idade (Fukuda, 1991). Schlenker e Goldman demonstraram que o declive da variação do V_E com a PaO_2 , a qual descreve a sensibilidade à hipoxia do sistema respiratório, aumenta em ratos conscientes de 24 meses (Schlenker & Goldman, 1985).

Há estudos em humanos que demonstram que a função do corpo carotídeo, expressa em sensibilidade ventilatória à hipoxia, diminui com a idade, resultando num menor aumento inicial da V_E em resposta à hipoxia aguda (Kronenberg & Drage, 1973;Peterson *et al.*, 1981;Poulin *et al.*, 1993). A natureza de um possível declínio funcional do corpo carotídeo não é clara, mas mecanismos possíveis poderão ser processos ocorrendo no parênquima ao longo da idade.

Contudo, esta questão é controversa dado que outros autores demonstraram uma resposta ventilatória à hipoxia mantida ao longo da idade, sugerindo não haver alteração da quimiossensibilidade periférica no envelhecimento (Kawakami *et al.*, 1981;Ahmed *et al.*, 1991;Smith *et al.*, 2001;Pokorski *et al.*, 2004;Vovk *et al.*, 2004;Preston *et al.*, 2009), ou até um aumento (Chapman & Cherniack, 1987;Pokorski & Antosiewicz, 2010). Comparando doentes parkinsónicos com idosos, foi observada uma ausência de efeito nas respostas ventilatórias à hipoxia moderada, mas uma diminuição da sensibilidade à hipoxia grave (Serebrovskaya *et al.*, 1998).

Quadro 1.1. Função do corpo carotídeo: efeito da idade em diferentes modelos experimentais

Modelo	Parâmetros	Efeito da idade	Referências
Ratos anestesiados	Aumento do V_E em resposta à hipoxia	Diminui	(Fukuda, 1992)
Humanos	Resposta do V_E à hipoxia	Diminui	(Kronenberg & Drage, 1973)
Humanos	Resposta do V_E à hipoxia	Diminui	(Peterson <i>et al.</i>, 1981)
Humanos	Resposta da f_R , V_T e V_E à hipoxia e hipercapnia	Diminui	(Chapman & Cherniack, 1987)
Humanos	Resposta do V_E à hipoxia	Diminui	(Poulin <i>et al.</i>, 1993)
Humanos	Resposta da f_R , V_T e V_E à hipoxia e hipercapnia	Ausência de efeito	(Kawakami <i>et al.</i>, 1981)
Humanos	Resposta do V_T à hipoxia	Ausência de efeito	(Ahmed <i>et al.</i>, 1991)
Humanos	Resposta do V_E à hipoxia	Ausência de efeito	(Smith <i>et al.</i>, 2001)
Humanos	Resposta do V_E à hipoxia	Ausência de efeito	(Pokorski <i>et al.</i>, 2004)
Humanos	Resposta do V_E à hipoxia	Ausência de efeito	(Vovk <i>et al.</i>, 2004)
Humanos	Declive da variação do V_E com a PaO_2	Ausência de efeito	(Preston <i>et al.</i>, 2009)
Ratos conscientes	Resposta da f_R e V_T à hipoxia; declive da variação do V_E com a PaO_2	Aumenta	(Schlenker & Goldman, 1985)
Ratos conscientes	Resposta da f_R , V_T e V_E à hipoxia	Aumenta	(Pokorski & Antosiewicz, 2010)
Doentes parkinsónicos	Declive da variação do V_E com a PaO_2	Ausência de efeito na hipoxia moderada, mas diminui na hipoxia grave	(Serebrovskaya <i>et al.</i>, 1998)

De facto, no homem foram observadas alterações em estudos nos quais os corpos carotídeos foram removidos *post mortem* (Hurst *et al.*, 1985;Lowe *et al.*, 1987b;Porzionato *et al.*, 2005): O parênquima de um corpo carotídeo senescente revela então alterações degenerativas. Ao longo da idade há uma diminuição gradual da percentagem de tecido glómico e uma fibrose progressiva, a qual parece seguir-se à conversão das células de suporte em fibroцитos. O facto mais notório é um considerável aumento da camada de tecido conectivo, o qual se estende da periferia dos lóbulos para o seu interior e que aparentemente causa um aumento de pressão nas células quimiorreceptoras, cujos núcleos apresentam forma alterada. Este crescimento do tecido fibroso vai separando as células principais até que apenas ninhos isolados destas células, ou mesmo a sua ausência, permaneçam dentro dos lóbulos, agora convertidos em agregados de células de sustentação ou tecido fibroso. Estas alterações conduzem a perda da integridade lobular, e portanto a uma aparência histológica desorganizada, com pequenos ninhos de tecido glómico separados por áreas maiores de tecido conectivo. Isto reflete-se numa diminuição do tamanho máximo dos lóbulos ao longo da idade. Os infiltrados linfocitários surgem anos antes da fibrose do parênquima se tornar aparente, e são particularmente prevalentes no idoso (Hurst *et al.*, 1985;Porzionato *et al.*, 2005).

Ao longo da idade instalam-se alterações nos vasos sanguíneos, e a árvore arterial glómica não é uma excepção a esta regra geral. A região da bifurcação carotídea e os seus principais ramos é particularmente susceptível ao desenvolvimento de ateroma e, uma vez que as artérias glómicas derivam das artérias carótidas externas, ou de ramos próximos da bifurcação, o suporte sanguíneo dos corpos carotídeos pode ficar comprometido. A adicionar a este facto, está a fibrose progressiva da íntima da árvore arterial glómica, a qual pode levar à oclusão. Parece provável que estas lesões oclusivas possam desempenhar um papel na redução gradual do tecido glómico e fibrose que ocorrem com a idade (Dymecka *et al.*, 2006).

Também foram encontradas alterações morfológicas no corpo carotídeo do rato velho (Pokorski *et al.*, 2004;Dymecka *et al.*, 2006): o aspecto mais evidente é o espessamento considerável do tecido conectivo, o qual aparentemente causa compressão das células quimiorreceptoras cujos núcleos vêm a sua forma alterada. Observam-se mitocôndrias edemaciadas, revelando crista interna distorcida ou ausente, o volume do Golgi está reduzido, e as vesículas de centro

denso são em menor número. Ocasionalmente, nos corpos carotídeos de animais velhos, observam-se células escuras, desidratadas, com citoplasma retraído e núcleos com heterocromatina muito irregular, uma imagem sugestiva de apoptose. Contudo, a imagem estrutural dos corpos carotídeos velhos é variável. Intercalando com as células quimiorreceptoras alteradas, observam-se ilhas de células de aparência normal. Surpreendentemente, a ultraestrutura da artéria carótida senescente está bem preservada. As células endoteliais e as junções entre elas parecem encontrar-se em perfeitas condições. Observam-se algumas alterações nas camadas arteriais mais profundas, tais como perda de continuidade das fibras elásticas, proliferação das fibras de colagénio e diferenças fenotípicas subtis das células musculares lisas. Não foram encontradas células espumosas ou acumulações de cálcio na parede vascular, as quais podem ser descritas como aterosclerose típica. Uma vez que o fornecimento de sangue e portanto de oxigénio ao corpo carotídeo é feito a partir da região da bifurcação da carótida, a conclusão óbvia é que as alterações nos corpos carotídeos decorrentes da idade são devidas a outros factores que não um fluxo sanguíneo insuficiente através das artérias *major* do órgão (Dymecka *et al.*, 2006).

Tanto no homem como no rato, a proporção relativa do tecido glómico que constitui os corpos carotídeos diminui com a idade: no homem, de uma percentagem média de 45 % no adulto jovem para 29 % no idoso, o que representa uma perda de tecido glómico de cerca de um terço ao longo da vida adulta (Hurst *et al.*, 1985); está descrita, ao longo do primeiro ano de vida do rato, uma diminuição da massa celular glómica do corpo carotídeo (Dymecka *et al.*, 2006; Conde *et al.*, 2006b). Contudo, e principalmente à custa do tecido conectivo, a área total dos corpos carotídeos aumenta ao longo da vida (Hurst *et al.*, 1985; Porzionato *et al.*, 2005; Dymecka *et al.*, 2006; Conde *et al.*, 2006b). O volume do corpo carotídeo aumenta não só com a idade, mas também na hipoxemia crónica devida a doença pulmonar ou a doença cardíaca cianótica congénita (Lack, 1978), e na hipertensão arterial (Habeck, 1986). Na literatura, também a maior percentagem de células tipo II foi demonstrada no envelhecimento (Hurst *et al.*, 1985), na hipoxemia crónica devida a doença pulmonar e na doença cardíaca cianótica congénita (Lack, 1978), bem como na hipertensão arterial (Habeck, 1986).

No rato, o processo de envelhecimento também é caracterizado por um aumento do conteúdo em catecolaminas do corpo carotídeo (Donnelly & Doyle,

1994; Conde *et al.*, 2006b); este mesmo fenómeno também pode ser observado no sangue durante a hipoxia crónica (Berne, 2004). Portanto, uma correlação entre a hipoxia crónica e o envelhecimento não pode ser posta de parte. Mas, ao longo da idade, constata-se uma diminuição na libertação de catecolaminas pelo corpo carotídeo, e da actividade do NSC em resposta à hipoxia (Conde *et al.*, 2006b).

A teoria dos ROS no envelhecimento estabelece que os organismos multicelulares sofrem alterações qualitativas ao longo do tempo, as quais estão associadas com a geração aumentada de ROS (Harman, 1956). As ROS também têm sido implicadas na actividade sensora do O₂ do corpo carotídeo (v. Capítulo 1.5.4.2): portanto, podem ser consideradas determinantes nas peculiaridades relacionadas com as respostas ventilatórias à hipoxia ao longo da idade (Kolesnikova *et al.*, 2003).

Os estudos da função do corpo carotídeo são frequentemente e no homem exclusivamente, indirectos, sendo a função analisada pela resposta ventilatória à hipoxia.

A questão da correlação entre a histologia do corpo carotídeo envelhecido e a sua função permanece por resolver. O conhecimento limitado nesta questão resulta da impossibilidade de conduzir estudos prospectivos morfológicos do órgão.

Dado que o envelhecimento é caracterizado por uma diminuição do aporte de O₂ aos tecidos (Hepple *et al.*, 2003), uma redução do PO₂ arterial (Cerveri *et al.*, 1995a) e da actividade de diversas enzimas e factores metabólicos (Drew & Leeuwenburgh, 2002), o corpo carotídeo representa um modelo experimental adequado para o estudo dos procesos de envelhecimento, dado os seus elevados fluxo sanguíneo e metabolismo relacionados com os mecanismos de sensibilidade ao O₂ (Di Giulio *et al.*, 2003a). Apesar da contribuição do presente trabalho para o conhecimento do efeito da idade nos mecanismos de sensibilidade ao O₂, o nosso estudo focou-se no controlo periférico da ventilação mediado pelo corpo carotídeo.

II CAPÍTULO

OBJECTIVOS

2 OBJECTIVOS

O corpo carotídeo pode ser um modelo experimental adequado para estudos de envelhecimento, dado o seu elevado fluxo sanguíneo e o metabolismo relacionado com os mecanismos sensores de O_2 ; portanto o corpo carotídeo pode servir como um meio para perceber se as modificações no fornecimento de O_2 às células são capazes de modular o processo de envelhecimento.

O objectivo geral da tese é contribuir para esclarecer os efeitos do envelhecimento na função dos quimiorreceptores periféricos. A persecução deste objectivo geral concretizou-se nos seguintes objectivos específicos:

- Examinar as alterações ocorridas em dados biométricos e variáveis cardiorespiratórias basais, que se desenvolveram nos ratos desde jovens adultos até atingirem a senescência;
- Contribuir para esclarecer os efeitos da idade na função dos quimiorreceptores periféricos com um modelo de isquémia, a qual é comum no idoso. Neste contexto, analizámos as respostas ventilatórias à isquemia carotídea em ratos velhos e anestesiados;
- Avaliar a resposta ventilatória mediada pelo corpo carotídeo à manipulação farmacológica da dopamina e da adenosina ao longo da idade;
- Investigar num modelo *in vitro* se o envelhecimento modifica as concentrações intracelulares de cAMP, o segundo mensageiro comum aos mediadores endógenos dopamina e adenosina.

III CAPÍTULO

MÉTODOS

3 MÉTODOS

Os estudos implementados nesta tese envolveram abordagens tanto *in vivo* como *in vitro*, e neste capítulo ficará descrito o método geral, ou seja os passos comuns à maioria das experiências.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Animais

As experiências foram realizadas em ratos macho Wistar com 3 (435.1 ± 8.3 g; $n=81$), 12 (604.3 ± 15.8 g; $n=67$) e 24 meses (616.7 ± 15.4 g; $n=72$). O grupo de 3 meses de idade pós-natal incluiu ratos com idade compreendida entre os 60 e os 100 dias. Os estudos efectuaram-se usando apenas ratos macho para evitar as diferenças de sexo nas respostas ventilatórias, nomeadamente à hipoxia (Mortola & Saiki, 1996). Os animais provieram do biotério da Faculdade de Ciências Médicas em compartimento com ar condicionado a $21 \pm 1^\circ$ C, humidade de 55 ± 10 % e com ciclo luz/escuro 12:12 h (com as luzes ligadas às 8:00 e apagadas às 20:00 h), com acesso a ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos experimentais foram realizados de acordo com as directrizes da UE para a utilização de animais de experiência (86/609/EEC), com o cuidado de minimizar o número de animais usados bem como o seu sofrimento. A investigadora possui certificação da FELASA (*Federation of Laboratory Animal Science Associations*) nível C.

3.1.2 Procedimentos cirúrgicos

A anestesia foi induzida inicialmente com uma injeção intraperitoneal única de pentobarbital de sódio (Eutasil; Sanofi-Veterinária, Miraflores, Algés, Portugal), nas doses de 60 mg Kg^{-1} e 40 mg Kg^{-1} , respectivamente nos animais jovens e animais velhos. Como a resposta a estímulos dolorosos é uma parte essencial da determinação da profundidade da anestesia, a ausência do reflexo podal era avaliado: simultaneamente, um membro era colocado em extensão e pinçada a pele entre os dedos; se o membro flectisse ou o animal vocalizasse, significava que a profundidade anestésica era insuficiente para realizar os procedimentos cirúrgicos. Já devidamente anestesiado, colocava-se o rato em supinação na mesa cirúrgica.

Realizava-se uma traqueostomia, seguida da inserção de uma cânula metálica (OD 2.0 mm, L 25 mm; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany) e ligação a um transdutor de pressão diferencial (Pneumotachometer PTM type 378/1.2; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany), por sua vez conectado a um amplificador de pressão (TAM-A transducer in a Plugsys Housings, model 603; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany). Expunham-se as artérias carótidas primitivas passando uma linha 1 cm abaixo da sua bifurcação, e era realizada vagotomia médiocervical bilateral para abolir o papel dos aferentes do vago que inervam os pulmões, e que têm uma influência *major* na actividade respiratória (Marek *et al.*, 2008). A vagotomia bilateral em ratos reduz a frequência respiratória e aumenta a amplitude da ventilação, sem causar uma alteração significativa da ventilação total (Monteiro & Ribeiro, 1991). Num animal controlo, os nervos glossofaríngeos foram isolados e seccionados bilateralmente e proximalmente ao ponto onde surge o NSC (NSCX; Figura 2.1 mostrando o local de secção).

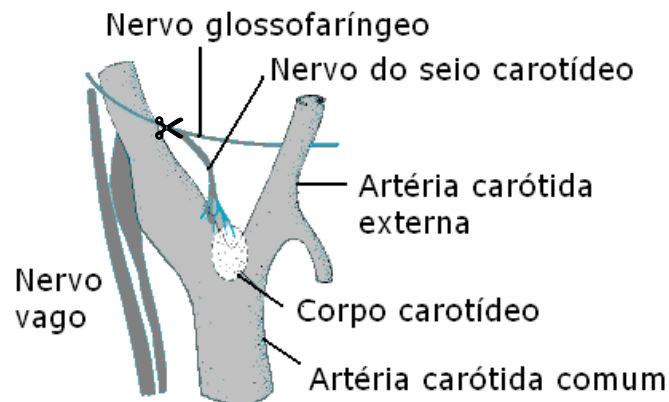


Figura 3.1. Secção dos nervos do seio carotídeo

Representação diagramática do corpo carotídeo e das estruturas anatómicas relacionadas (Berne, 2004). O local da secção está indicado com o símbolo da tesoura.

O registo directo e contínuo da pressão arterial (PA) sistémica e os suplementos anestésicos foram realizados através da introdução de cateteres de PVC, flexíveis e translúcidos (Cateter Stériflex 30 cm 167.10, 0.5 a 1.0 mm ; Vygon, Maia, Portugal), respectivamente na artéria e na veia femorais direitas. Para levar a cabo a cateterização foi utilizado um microscópio binocular de dissecação (Nikon

SMZ-2B). Todos os cateteres utilizados nestas experiências foram preenchidos com heparina (100 UI mL^{-1} ; sal sódico de heparina; B. Braun Medical, Barcarena, Oeiras, Portugal). Para o registo contínuo da PA, o cateter inserido na artéria femoral foi conectado através de uma torneira de três vias a um transdutor de pressão (Isotec Pressure Transducer range -50 a 300 mmHg; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany). O transdutor de pressão, por sua vez, conectado a um amplificador de pressão (TAM-A transducer in a Plugsys Housings, model 603; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany), e o sinal amplificado enviado via conversor analógico/digital para um computador onde foi registado por *software* específico (Pulmodyn® W; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany). Os dados ficaram deste modo armazenados no sistema de disco rígido para posterior análise.

Simultaneamente com a calibração eléctrica automática providenciada pelo transdutor de pressão, foram efectuadas verificações periódicas da calibração do transdutor, expondo-o a pressões conhecidas de um calibrador electrónico de pressões (KAL 84 M, Range 0-199.9 mmH₂O; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany). Um sensor de oximetria (SurgiVet V90004 Capnograph; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany) permitiu uma monitorização contínua da PO₂ através de um sensor rectal.

O nível de profundidade da anestesia foi avaliado durante a cirurgia pela ausência dos reflexos corneano e podal e, durante a experiência, monitorizando a estabilidade da PA e frequência cardíaca (FC), e quaisquer efeitos mínimos nas variáveis cardiovasculares em resposta à estimulação dos dedos e/ou cauda. Suplementos endovenosos de 10 % da dose inicial de pentobarbital de sódio foram administrados quando necessário. A temperatura corporal foi mantida num valor de aproximadamente $37 \pm 1^\circ \text{C}$ através de uma pequena manta eléctrica aquecida e comandada por um termosensor rectal (Small Homeothermic Blanket; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany).

Após um período de recobro cirúrgico de aproximadamente 30 min, sensivelmente quando as linhas de base das variáveis ventilatórias e cardiovasculares se apresentavam estáveis, foi iniciado o protocolo experimental, o qual será descrito em detalhe nos diferentes capítulos.

As experiências duraram em média 8:00 h, e no final os ratos foram eutanasiados através de uma injeção intravenosa (I.V.) de uma dose letal de pentobarbital de sódio (180 mg Kg^{-1}), de acordo com os procedimentos *standard*

e com as directivas da União Europeia e a Legislação Portuguesa (Portaria nº 1131 / 97 de 7 Novembro, I – B série).

3.1.3 Registo dos parâmetros ventilatórios

No decorrer das experiências, a cânula traqueal permitiu que o fluxo de ar se direccionasse através dum pneumotacógrafo ligado a um transdutor de pressão diferencial e a um amplificador de corrente, permitindo assim obter o registo do fluxo aéreo pulmonar (PulmFI; ml/sec).

Na Figura 3.1. mostra-se uma ilustração esquemática dos dispositivos usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios em ratos anestesiados e respirando espontaneamente.

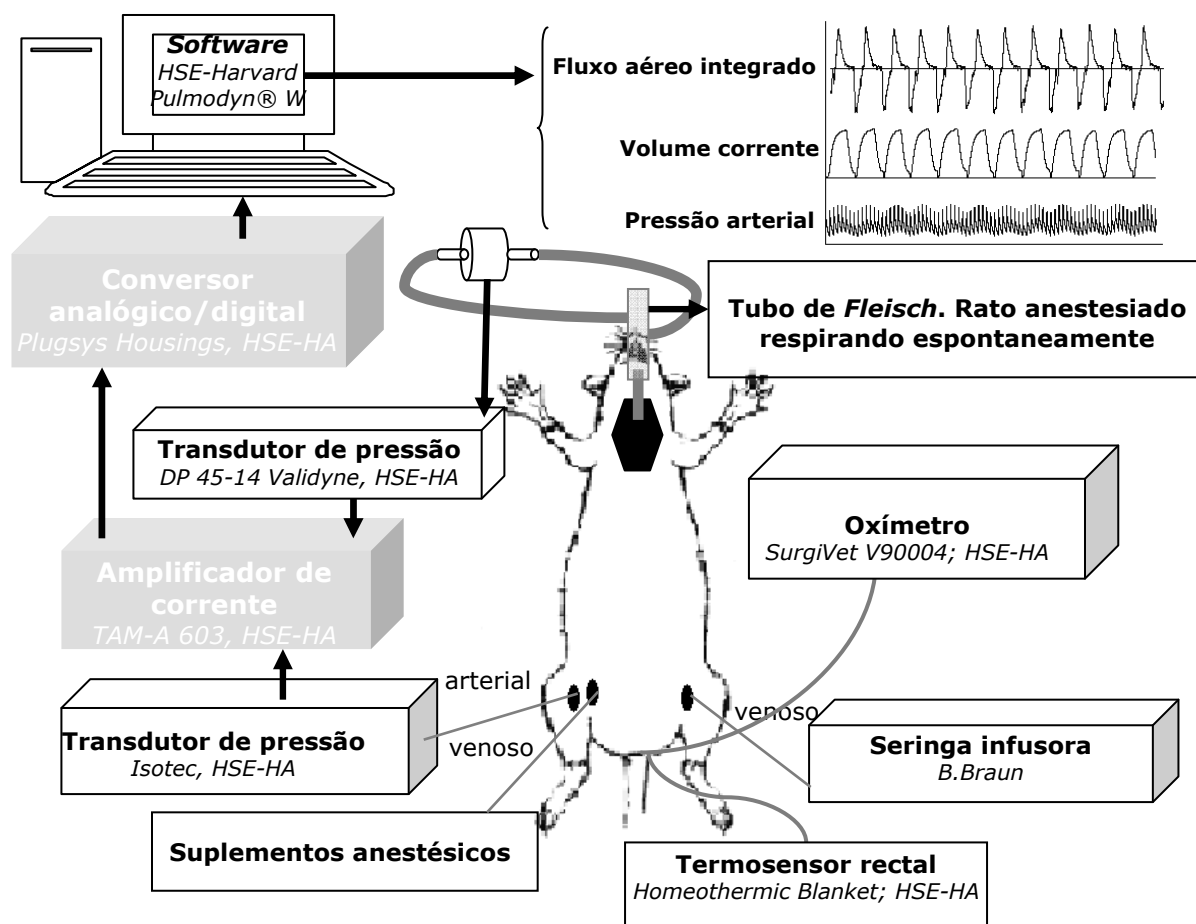


Figura 3.2. Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios

Os ratos eram anestesiados, vagotomizados e respiravam espontaneamente. Deste modo tínhamos acesso ao efeito dos vários estímulos estudados nas variáveis cardioventilatórias.

3.1.4 Calibração do pneumotacógrafo

Foi essencial manter a tela metálica da cabeça do pneumotacógrafo limpa e seca, e proceder à calibração frequente para um bom desempenho e precisão nas medições (Kreit & Sciurba, 1996). A saturação do ar com vapor de água diminui a variação de pressão através da membrana onde passa o fluxo de ar e, conseqüentemente, a velocidade de leitura do fluxo do gás (Hobbes, 1967). No decorrer das experiências, para minimizar a condensação do vapor de água expiratório e evitar a oclusão da tela, procedeu-se periodicamente à desconexão da cabeça de fluxo da cânula traqueal, e fez-se passar ar seco. Apesar do pneumotacógrafo usado restaurar o zero automaticamente e regularmente, antes do início dos registos de cada experiência procedia-se à reinicialização manual para uma maior precisão.

A calibração e a correcção das unidades (mililitros, mL vs. Volts, V) foram realizadas usando seringas calibradas que permitiram injectar manualmente volumes conhecidos (0,5; 1,0 e 2,0 mL). A calibração expiratória foi realizada conectando a seringa à extensão expiratória da cabeça de fluxo (rotineiramente ligada à cânula traqueal durante os registos), e a calibração inspiratória à outra extensão. Um exemplo de um processo de calibração está ilustrado na Figura 3.2.

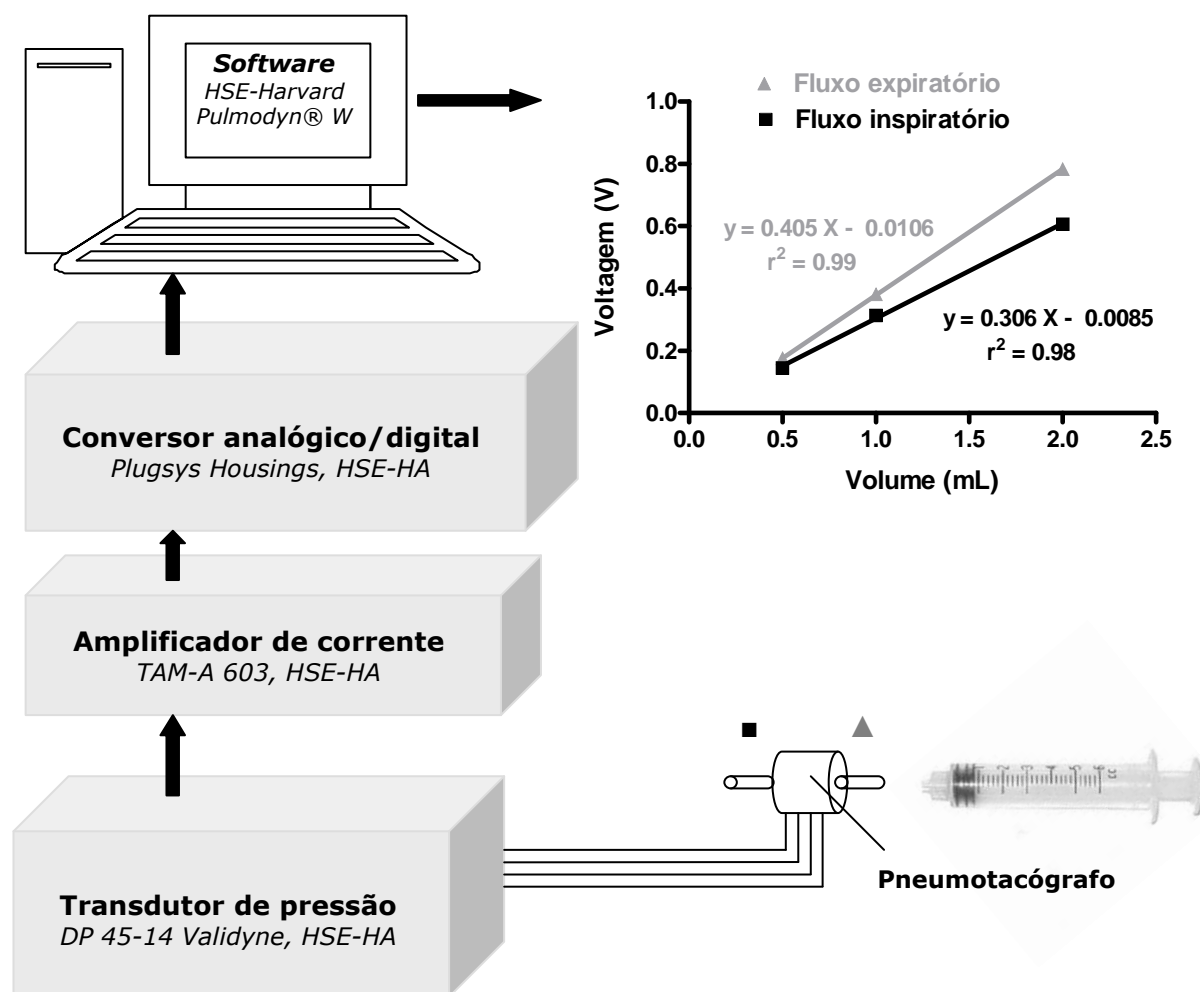


Figura 3.3. Calibração do pneumotacógrafo

O processo de calibração foi realizado frequentemente para assegurar a precisão dos dados obtidos a partir dos registos do fluxo aéreo traqueal integrado. O exemplo que se apresenta ilustra a correlação entre volumes conhecidos de ar (eixo dos X, mL) e as tensões resultantes (eixo dos Y, V). Cada volume (0,5; 1,0 ou 2,0 mL) foi injectado diversas vezes via cada um dos dois membros da cabeça de fluxo, representando o fluxo expiratório (▲) ou o fluxo inspiratório (■). As equações resultantes foram resolvidas de modo adequado tendo por objectivo converter V em mL. No exemplo da figura, a equação expiratória seria $\text{mL} = 2,469 V + 0,028$ e a equação inspiratória seria $\text{mL} = 3,271 V + 0,220$.

3.1.5 Dados e análise estatística

A aquisição dos dados cardioventilatórios (PulmFI , V_T , f_R , PAM e FC) foi obtida continuamente durante as experiências através de *software* específico (Pulmodyn® W; HSE-HA GmgH, March-Hugstetten, Germany). Nos registos originais, a tensão aumentava a partir do zero com a inspiração, voltando à linha de base no final da mesma, e diminuía a partir do zero na expiração. Portanto, tensões positivas indicavam volumes inspiratórios e tensões negativas indicavam volumes expiratórios, o que facilitava a leitura destas variáveis no monitor. A f_R e o V_T foram calculados a partir da integração do

PulmFI. O volume minuto respiratório (V_E) espontâneo em ar ambiente corresponde ao produto do volume tidal inspiratório (V_{Ti}) pela f_R . Os V_T e V_E foram normalizados para o peso corporal (mL Kg^{-1} e $\text{mL min}^{-1} \text{Kg}^{-1}$, respectivamente).

Na comparação entre animais jovens e velhos, os efeitos da isquemia e fármacos foram expressos em percentagem, sendo que cada animal serviu como o seu próprio controle.

Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M., e a significância estatística foi avaliada utilizando o teste t de Student para dados não emparelhados (comparação entre novos e velhos) ou emparelhados (comparação entre o efeito dos FF no mesmo animal), tomando os valores de $p < 0,05$ como significativos, usando o *software GraphPad Prism* (versão 4.03), o qual também realizou os gráficos que se irão apresentar nos resultados das experiências.

IV CAPÍTULO

EFEITO DA IDADE NOS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS E CARDIOVASCULARES BASAIS

4 EFEITO DA IDADE NOS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS E CARDIOVASCULARES BASAIS

4.1 INTRODUÇÃO

Um problema importante na investigação sobre o envelhecimento é o intervalo de tempo necessário para observar o mesmo indivíduo ao longo de toda a sua vida. Uma vez que os estudos longitudinais são muitas vezes impraticáveis, são usados os estudos transversais como alternativa. O mais frequente é serem escolhidos grupos de jovens adultos e velhos de uma população e, num dado momento, serem comparadas uma ou mais características. De modo inerente a este desenho, encontra-se assumido que: a) o desenvolvimento dos indivíduos mais jovens esteja completo para que as diferenças encontradas não possam ser atribuídas a diferenças de maturação; b) os indivíduos mais velhos sejam representantes aleatórios dos sobreviventes daquela população jovem; c) todos os animais velhos se encontrem em estado de boa saúde.

A morfologia e a função do sistema respiratório sofrem alterações à medida que a idade avança. Estudos efectuados ao longo da idade demonstram que os ratos velhos revelam uma doença pulmonar obstrutiva crónica semelhante ao enfisema pulmonar observado no ser humano (Saldiva *et al.*, 1988a).

No rato, o envelhecimento está também associado a alterações endocrinológicas, como a resistência à leptina e à insulina, e a alterações metabólicas caracterizadas de modo evidente pela diferente distribuição do tecido adiposo, as quais conduzem à obesidade (Fukuda, 1991;Fukuda, 1992). Como a adiposidade aumenta ao longo da idade na maioria das espécies de ratos (Lesser *et al.*, 1973), e sendo o excesso de massa adiposa uma determinante major da falência respiratória nos animais velhos, torna-se extremamente difícil diferenciar entre a idade e a obesidade como a causa da deterioração ventilatória. Esta questão não é tão marcante nos ratos Wistar dado que sob dieta padrão eles não atingem um nível marcado de obesidade, mas antes uma percentagem de gordura total não excedendo 35% do peso corporal (Newby *et al.*, 1990).

Objectivos

As experiências descritas neste capítulo tiveram como objectivo determinar qual o efeito do envelhecimento nos parâmetros cardiorespiratórios em condições basais, ou seja na ausência de uma estimulação específica dos quimiorreceptores do corpo carotídeo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os pesos e registos dos parâmetros cardiorespiratórios de ratos macho Wistar com 3 ($431,0 \pm 7,4$ g; $n=24$), 12 ($618,1 \pm 16,9$ g; $n=24$) e 24 meses ($641,0 \pm 11,3$ g; $n=24$), anestesiados e vagotomizados.

4.3 RESULTADOS

A Figura 4.1 e o Quadro 4.1 revelam um aumento do peso corporal dos ratos entre os 3 e os 24 meses de idade. Este aumento já é aparente aos 12 meses e mantém-se nas idades mais avançadas sem diferença estatisticamente significativa comparando com os animais de 12 meses.

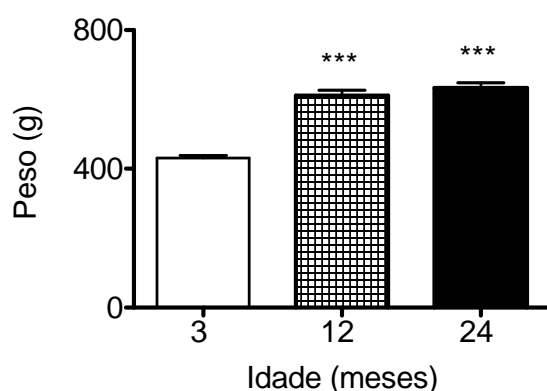


Figura 4.1. Efeito da idade na evolução do peso corporal

Os dados representam média \pm S.E.M, $n = 24$, *** $p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test, comparado com ratos de 3 meses.

O aumento do peso dos corpos carotídeos dos ratos entre os 3 e os 24 meses de idade encontra-se ilustrado na Figura 4.2. No grupo dos 3 meses de idade, o seu peso médio era $50,2 \pm 1,9$ μ g ($n = 24$); no de 12 meses, o peso médio dos corpos carotídeos não era estatisticamente diferente daquele dos corpos carotídeos dos ratos de 3 meses, sendo $45,9 \pm 2,2$ μ g; e nas idades mais avançadas o peso dos corpos carotídeos atingiu um valor médio de $69,3 \pm 4,5$ μ g.

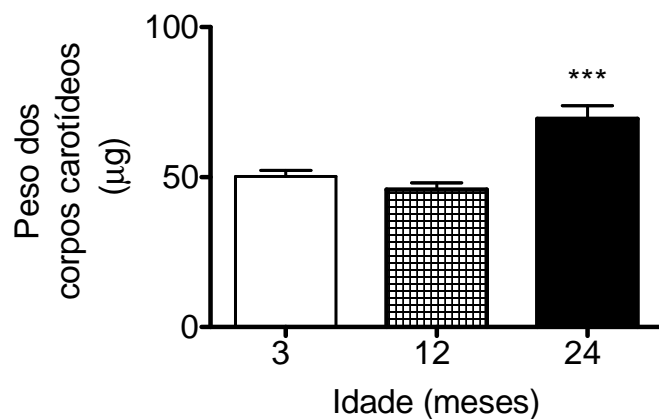


Figura 4.2. Efeito da idade na evolução do peso dos corpos carotídeos

Os dados representam média \pm S.E.M, $n=24$, *** $p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test, comparado com ratos de 3 meses.

Os efeitos da idade nos parâmetros cardioventilatórios em animais anestesiados estão ilustrados na Figura 4.3. Os valores basais da f_R mantiveram-se constantes ao longo da idade. Já os de V_T , e consequentemente os de V_E , diminuíram de modo significativo ($p < 0,01$) a partir dos 12 meses de idade (Figura 4.3.).

Os valores basais de FC e PA nos ratos de 12 meses eram mais baixos do que aqueles observados em ratos de 3 meses de idade, mas não estatisticamente diferentes daqueles registados nos animais mais velhos (Figura 4.3.; Quadro 4.1.).

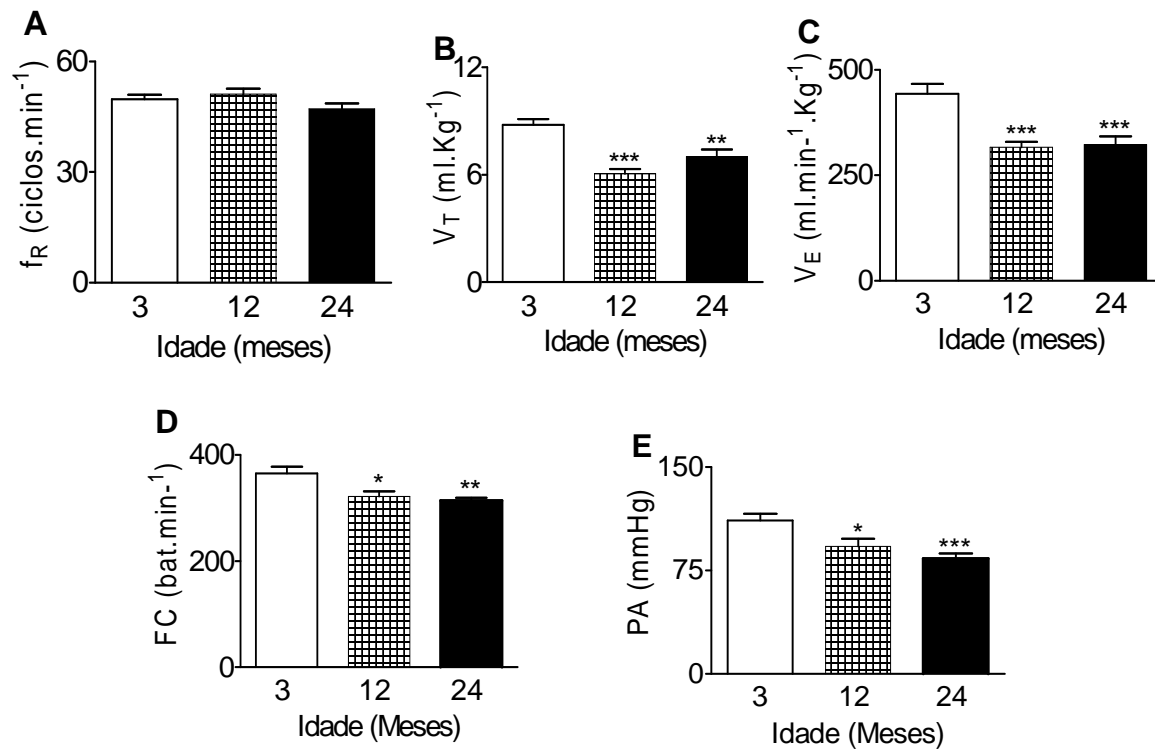


Figura 4.3. Efeito da idade nos parâmetros respiratórios e cardiovasculares basais

Os gráficos representam o efeito da idade nos valores basais da f_R , V_T , V_E , FC e PA em ratos de 3, 12 e 24 meses anestesiados e respirando espontaneamente ($n=24$). Os dados representam média \pm S.E.M, * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test comparado com ratos de 3 meses.

Quadro 4.1. Dados biometricos e variáveis cardioventilatórias basais dos ratos envolvidos neste estudo

Idade	3 M (n=24)	12 M (n=24)	24 M (n=24)
Peso corporal (g)	431,0 ± 7,4	618,1 ± 16,9***	641,0 ± 11,3***
Peso do corpo carotídeo (µg)	49,0 ± 7	46,0 ± 8	70,0 ± 10,0***
f_R (ciclos min⁻¹)	38,5 ± 0,4	52,3 ± 1,5	46,6 ± 1,5
V_T (mL Kg⁻¹)	8,8 ± 0,3	6,0 ± 0,3***	7,0 ± 0,4**
V_E (mL min⁻¹ kg⁻¹)	442,5 ± 24,2	316,4 ± 12,4***	322,9 ± 18,8***
FC (batimentos min⁻¹)	360,3 ± 12,8	322,2 ± 9,2*	313,7 ± 5,7**
PA (mmHg)	111,4±4,8	92,6±5,4*	83,7±3,8***
Idade	3 M (n=24)	12 M (n=24)	24 M (n=24)
Peso corporal (g)	431,0 ± 7,4	618,1 ± 16,9***	641,0 ± 11,3***
Peso do corpo carotídeo (µg)	49,0 ± 7	46,0 ± 8	70,0 ± 10,0***
f_R (ciclos min⁻¹)	38,5 ± 0,4	52,3 ± 1,5	46,6 ± 1,5
V_T (mL Kg⁻¹)	8,8 ± 0,3	6,0 ± 0,3***	7,0 ± 0,4**
V_E (mL min⁻¹ kg⁻¹)	442,5 ± 24,2	316,4 ± 12,4***	322,9 ± 18,8***
FC (batimentos min⁻¹)	360,3 ± 12,8	322,2 ± 9,2*	313,7 ± 5,7**
PA (mmHg)	111,4±4,8	92,6±5,4*	83,7±3,8***

Os valores são média ± S.E.M. Relativamente aos ratos de 12 e 24 meses são assinaladas as diferenças significativas comparando com os ratos de 3 meses de idade (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney, *p < 0,01; **p < 0,001; ***p < 0,0001).

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo projectou-se examinar, ao longo da idade, as alterações em dados biométricos e variáveis cardiorespiratórias basais que se desenvolvem nos ratos desde jovens adultos até atingirem a senescência, e que vão ser utilizados noutros capítulos do presente trabalho. A importância deste objectivo reside na necessidade da obtenção de valores controlo – ausência de estímulo dos quimiorreceptores – em ratos anestesiados e vagotomizados.

O peso aumentou com a idade logo a partir dos 12 meses de idade; os valores basais da f_R mantiveram-se constantes, mas os de V_T e V_E diminuíram de modo significativo nos ratos de 12 e 24 meses de idade. Os valores basais da FC e PA nos ratos de 12 meses eram mais baixos do que aqueles observados em ratos de 3 meses de idade, mas não estatisticamente diferentes daqueles registados nos animais mais velhos.

Foi descrito previamente que a frequência respiratória diminui com o aumento do tamanho dos animais (Tenney & Bartlett, Jr., 1967), bem como diminui de um modo linear com o envelhecimento do rato (Fukuda, 1991; Yamazaki *et al.*, 2002; Soulage *et al.*, 2004; Pokorski & Antosiewicz, 2010). Nas condições experimentais do nosso modelo encontramos um aumento significativo do peso do rato logo a partir dos 12 meses, mas os valores basais de f_R mantiveram-se constantes ao longo da idade. O facto dos animais estarem sob o efeito de anestesia com pentobarbital e serem vagotomizados, pode explicar a ausência de ratos velhos mais bradipneicos encontrados por outros autores (Soulage *et al.*, 2004; Dimkpa & Ibhazehiebo, 2009; Pokorski & Antosiewicz, 2010). A ausência de alterações na f_R quando está abolido, pela vagotomia, o impulso dos receptores *major* pulmonares de estiramento e a actividade do SNC está deprimida pelo barbitúrico, sugere que as alterações da f_R no idoso ou em animais envelhecidos não pode ser atribuída a uma deterioração do corpo carotídeo.

Os ratos Wistar apresentaram, nas condições presentes, uma diminuição do V_T ao longo da idade. Apesar de alguns autores não encontrarem uma diminuição do V_T no envelhecimento (Soulage *et al.*, 2004), tem sido comumente observada uma diminuição relacionada com a idade em ratos (Nagase *et al.*, 1994a; Pokorski & Antosiewicz, 2010) e em humanos (Krumpe *et al.*, 1985; Janssens *et al.*, 1999), a qual tem sido associada a alterações das propriedades mecânicas do pulmão e do tórax (Saldiva *et al.*, 1988a). De facto, em repouso, os humanos idosos saudáveis apresentam um V_E idêntico ao dos

indivíduos jovens, mas com menor V_T e maior f_R (Krumpe *et al.*, 1985; Janssens *et al.*, 1999).

Os efeitos da idade no sistema cardiovascular são: uma atenuação na frequência cardíaca nos humanos (Kronenberg & Drage, 1973; Fleg *et al.*, 1995); nos ratos, um efeito não significativo da idade na frequência cardíaca em repouso (Gordon, 2008; Dimkpa & Ibhazehiebo, 2009); e aumento da pressão arterial, tanto em humanos (Fleg *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 2009) como em ratos (Dimkpa & Ibhazehiebo, 2009; Di Nardo *et al.*, 2009). No presente trabalho, a pressão arterial média era mais baixa nos ratos velhos do que nos jovens adultos. Este facto pode ser atribuído ao efeito depressor cardiovascular a nível central mediado pelo anestésico (Schwenke & Cragg, 2004), sobrepondo-se aos efeitos da aterosclerose. É conhecido que o risco de depressão cardiovascular provocado pelos barbitúricos é mais elevado no idoso (Schwenke & Cragg, 2004), o que é compatível com os valores mais baixos de PA encontrados no presente trabalho, não obstante a dose de pentobarbital administrada inicialmente aos ratos idosos ser inferior (40 mg Kg^{-1} , I.P.) à dos adultos jovens (60 mg Kg^{-1} , I.P.), e os ratos idosos necessitem de menor número de suplementos anestésicos.

Para além da depressão cardiovascular, é bem conhecido que, de um modo geral, todos os regimes anestésicos causam depressão respiratória e metabólica (Flecknell, 1993). Com os barbitúricos podemos observar uma depressão cardíaca e respiratória, com um tempo de recuperação prolongado e predisposição para a hipotermia (Johansen *et al.*, 1994). O pentobarbital é comumente usado como anestésico em experimentação animal (Flecknell, 1993), possuindo um tempo de semi-vida de 20-30 horas, e foi escolhido porque produz uma actividade ventilatória de base estável (Young, 1957), e não afecta ou pode até potenciar a reactividade reflexa respiratória à estimulação dos quimiorreceptores (Douglas *et al.*, 1950). Também Biscoe e Millar (1968) puderam verificar que o pentobarbital não afecta de modo significativo a actividade dos quimiorreceptores carotídeos (Biscoe & Millar, 1968). Além disso, alguns autores observaram que a magnitude da resposta do V_E à hipoxia e hipercapnia não se altera sob anestesia com pentobarbital (Schwenke & Cragg, 2004).

De um modo geral, a anestesia deprime predominantemente a f_R , tendo pouco ou nenhum efeito no V_T (Wixson *et al.*, 1987). Nalguns estudos está descrito que o pentobarbital deprime o V_E em 30 %, mas por vezes um aumento do V_T

contrabalança a diminuição da f_R , não chegando a ser observada uma depressão no V_E (Schwenke & Cragg, 2004).

Durante a fase de indução, os ratos podem experimentar uma hiperexcitabilidade inicial, incluindo hiperalgesia (Field *et al.*, 1993). No entanto, tem sido demonstrado que a administração de pentobarbital é mais segura em ratos do que noutros animais de experiência, conseguindo uma anestesia durando 60-120 minutos (Wixson *et al.*, 1987). De realçar que o pentobarbital tem sido usado para a cateterização carotídea em ratos (Lawson *et al.*, 2001). Por outro lado, comparando com outros anedtésicos injectáveis, o efeito do pentobarbital na FC do rato é muito reduzido (Sage *et al.*, 1985; Wixson *et al.*, 1987). Também têm sido documentadas hipotensão e acidose respiratória não compensada nos ratos (Field *et al.*, 1993; Eager *et al.*, 1994); contudo, outros autores não encontram alteração nas concentrações de lactato do sangue arterial, indicando não haver alteração do estado metabólico dos animais (Schwenke & Cragg, 2004). Quando comparado com os neuroleptanalgésicos nos ratos, o pentobarbital incorre num impacto mínimo ou ausência de impacto nos níveis de glucose no sangue, os quais podem influenciar a função do corpo carotídeo (Johansen *et al.*, 1994). Tal como já referido, a dose inicial de anestésico administrada aos animais velhos era menor do que a administrada aos adultos jovens, e em geral necessitavam menor número de suplementos anestésicos para suprimir os reflexos à dor durante as experiências. Esta diferença tem sido atribuída a questões farmacocinéticas que se instalam na idade mais avançada, na qual a depuração intercompartimental é 30% menor comparativamente aos indivíduos jovens, resultando em concentrações mais elevadas e mais fármaco disponível para distribuição no cérebro (Bowie & Slattum, 2007). De qualquer modo, não têm sido encontradas diferenças na responsividade do cérebro ao longo da idade, nomeadamente não foram detectadas alterações na acção de moduladores do receptor do GABA tipo A como o pentobarbital (Griffith *et al.*, 2000).

O efeito depressor do pentobarbital opõe-se ao resultado da secção dos nervos vagos: pós-vagotomia a linha de base da FC e PA eleva-se, como esperado, porque se perdeu o tonus vagal. Os sinais parasimpáticos eferentes conduzidos pelo nervo vago modulam a activação simpática por diminuírem a FC e baixarem os valores da PA (Slamowitz *et al.*, 1999).

Em conclusão, tanto o peso corporal dos ratos como o dos respectivos corpos carotídeos aumenta entre os 3 e os 24 meses de idade: a diferença entre estes

dois dados biométricos, é que o aumento do peso corporal manifesta-se logo nos animais de 12 meses, e o aumento do peso dos corpos carotídeos só se torna aparente nos animais mais velhos. Os valores basais da f_R mantiveram-se constantes ao longo da idade. Já os de V_T , e consequentemente os de V_E , diminuíram de modo significativo a partir dos 12 meses de idade. Os valores basais de FC e PA nos ratos de 12 meses eram mais baixos do que aqueles observados em ratos de 3 meses de idade, mas não estatisticamente diferentes daqueles registados nos animais mais velhos. Os achados relativos a FC, PA, V_T e V_E estão de acordo com o descrito na literatura. Neste capítulo observámos pela primeira vez que a f_R se mantém ao longo da idade. Foram obtidos os valores controlo a serem utilizados em capítulos seguintes.

V CAPÍTULO

EFEITO DA IDADE NAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA CAROTÍDEA

5 EFEITO DA IDADE NAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA CAROTÍDEA

5.1 INTRODUÇÃO

Há razões para pensar que a resposta ventilatória à hipoxia diminua ao longo da idade. No homem, os volumes pulmonares, as estruturas alveolares e a quantidade de ar alveolar, tudo diminui com a idade (Chan & Welsh, 1998; Janssens *et al.*, 1999). A mecânica da parede torácica deteriora-se, e a bomba muscular respiratória enfraquece (Frank *et al.*, 1957; Chan & Welsh, 1998). Além disso, o corpo carotídeo, o qual é o principal quimiorreceptor periférico gerando a resposta ventilatória à hipoxia, apresenta alterações degenerativas relacionadas com a idade (Pokorski *et al.*, 2004; Dymecka *et al.*, 2006), esperando-se que o impulso nervoso mediado pelo NSC e a sua integração nas áreas respiratórias centrais estejam diminuídos com o envelhecimento (Di Giulio *et al.*, 1998).

Intuir-se-ia, então, que as alterações relacionadas com a idade a nível do sistema respiratório teriam como consequência uma diminuição da resposta ventilatória à hipoxia, mas a evidência científica não é clara. Estudos em humanos de várias idades em estado de alerta revelaram quer diminuição (Kronenberg & Drage, 1973; Peterson *et al.*, 1981), quer ausência de alteração (Kawakami *et al.*, 1981; Pokorski & Marczak, 2003) ou até aumento na resposta ventilatória à hipoxia no idoso (Chapman & Cherniack, 1987; Serebrovskaya *et al.*, 1998).

Os estudos em animais sobre este assunto são esparsos e igualmente variáveis. Schlenker e Goldman (Schlenker & Goldman, 1985) demonstraram que a sensibilidade do sistema respiratório à hipoxia que é determinado pelo declive A obtido da função curvilínea que relaciona o volume minuto (V_E) com a pressão expirada de O_2 (P_{ETO_2}) ($V_E = V_{E0} + A (P_{ETO_2} + 32)^{-1}$; V_{E0} a assíntota para a ventilação) (Bernardi *et al.*, 2001), aumenta nos animais de 24 meses e conscientes: um maior valor de A implica maior alteração no V_E por alteração no P_{ETO_2} , portanto uma maior resposta ventilatória à hipoxia.

Em ratos anestesiados, Fukuda (Fukuda, 1992) descobriu que o V_E durante a hipoxia, mas não a sensibilidade à hipoxia, é atenuado de forma gradual com o avanço na idade. Contudo, esta atenuação é perdida quando a V_E é normalizada pela taxa metabólica, a qual diminui com a idade.

A interpretação da alteração na reactividade à hipoxia ao longo da idade é dificultada pela escassez de estudos pertinentes, pelas diferentes condições experimentais utilizadas, e pela falta de estudos longitudinais nos quais o mesmo animal seria testado para a hipoxia com o passar do tempo. Relativamente a estudos longitudinais, apenas encontrámos o trabalho recentemente publicado de Pokorski e Antosiewicz, o qual apresenta um estudo longitudinal com ratos de 12 e 24 meses, mas sendo os ratos jovens de 3 meses um grupo à parte (Pokorski & Antosiewicz, 2010).

Para clarificar a aparente contradição entre os resultados relativos às alterações morfológicas observadas *in vitro* em corpos carotídeos isolados no rato (Pokorski *et al.*, 2004; Dymecka *et al.*, 2006) e no homem (Hurst *et al.*, 1985; Lowe *et al.*, 1987a; Porzionato *et al.*, 2005), e a alteração da função do corpo carotídeo no homem (Kronenberg & Drage, 1973; Peterson *et al.*, 1981; Chapman & Cherniack, 1987; Ahmed *et al.*, 1991; Poulin *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2001; Pokorski *et al.*, 2004; Vovk *et al.*, 2004), pensámos que estudos funcionais em modelos *in vivo* poderiam colmatar este hiato no conhecimento relativamente à função do corpo carotídeo ao longo da idade.

O entendimento dos mecanismos básicos e da prevenção de qualquer doença reside principalmente no desenvolvimento com sucesso de um modelo experimental.

A isquémia (do Grego *ισχαιμία*, *ischaimía*, *isch-* restrição, *hema* ou *haema* sangue) é uma diminuição no fornecimento de sangue geralmente devido a fenómenos que ocorrem nos vasos sanguíneos (vasoconstrição, trombose, embolia, por exemplo), resultando na lesão ou disfunção do tecido. A lesão isquémica é desencadeada pela falta de oxigenação dos tecidos (hipoxia), bem como pelo défice em glicose e outros nutrientes (Modis *et al.*, 2009).

Um modelo de hipoxia pode substituir a isquemia na pesquisa de fármacos destinados à terapêutica citoprotectora na cardiopatia isquémica (Casals *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2010).

Outros autores têm verificado equivalência de resultados entre um modelo isquémico *in vivo* e um modelo de hipoxia *in vitro* em estudos quer da hemostase do oxigénio (Zhang *et al.*, 2009), quer da fisiopatologia dos acidentes vasculares cerebrais (Chen & Chang, 2009).

A oclusão bilateral da artéria carótida comum (OCC) durante curtos períodos (s) tem sido usada como um modelo funcional agudo para acesso às respostas

quimiossensoras periféricas (Alcayaga *et al.*, 1986; Iturriaga *et al.*, 1988; Monteiro & Ribeiro, 1989), mas desconhecem-se os efeitos do envelhecimento nas respostas do corpo carotídeo à isquemia aguda.

Objectivos

Como já foi dito, os efeitos da idade na função dos quimorreceptores periféricos são controversas, pelo que iremos tentar contribuir para esclarecer este assunto com um modelo de isquémia, a qual é comum no idoso. Neste contexto, analizámos a reactividade respiratória à isquémia em ratos envelhecidos e anestesiados. Atingimos este objectivo comparando a resposta ventilatória às OCCs, por breves segundos, em ratos jovens e velhos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Nas experiências descritas no presente capítulo utilizaram-se ratos macho Wistar com 3 (410.9 ± 8.7 g; $n=8$), 12 (564.0 ± 22.3 g; $n=10$) e 24 meses (528.6 ± 18.5 g; $n=10$).

Em todos os grupos de experiências (3, 12 e 24 meses) foi efectuado o mesmo protocolo experimental num animal antes e após a secção bilateral do NSC para investigar se as respostas à isquemia dependiam dos quimiorreceptores periféricos ou dos efeitos no SNC.

O protocolo experimental consistiu num modelo de isquémia utilizando a oclusão do lúmen da artéria carótida comum bilateralmente (OCC). A oclusão do lúmen arterial era levado a cabo pela acção de linha cirúrgica colocada em torno de cada artéria carótida comum 1 cm abaixo da bifurcação, tendo cuidado para minimizar o estiramento da bifurcação carotídea. Eram realizadas três sequências de OCCs de 5, 10 e 15 s, com um intervalo de pelo menos cinco minutos entre cada duas OCCs.

Os valores de controlo da f_R , V_T , PA e FC corresponderam ao valor médio medido num período de vinte e cinco segundos imediatamente antes da OCC. Durante a OCC, os valores de f_R , V_T , PA e FC considerados correspondiam ao efeito máximo medido naquele intervalo de tempo, e foram comparados com os controlos.

Na Figura 5.1. mostra-se uma ilustração esquemática dos dispositivos usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios em ratos anestesiados e respirando espontaneamente, bem como o local das OCCs. Para uma descrição mais pormenorizada, consultar capítulo geral dos métodos (Capítulo 2).

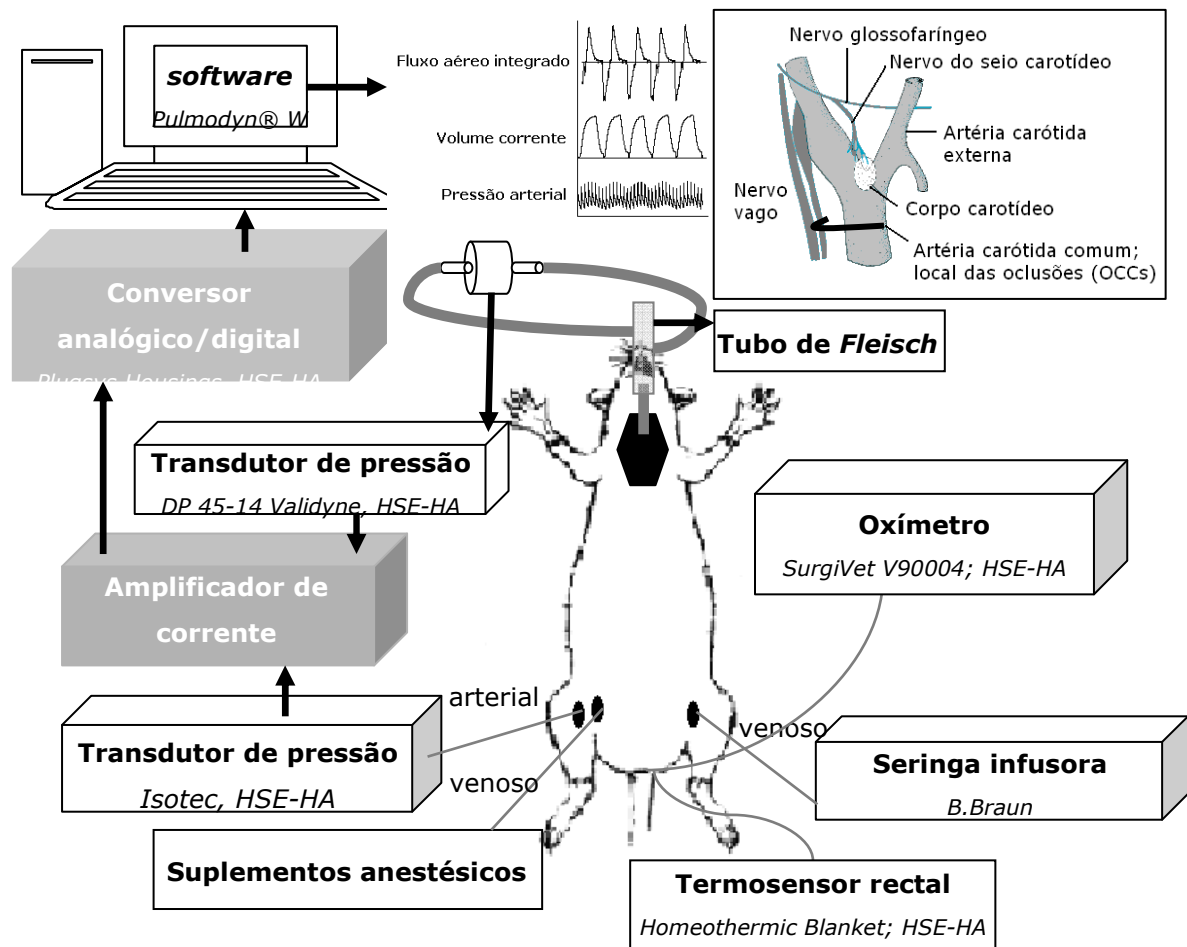


Figura 5.1. Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registro dos parâmetros cardioventilatórios

Os ratos eram anestesiados, vagotomizados e respiravam espontaneamente. Deste modo tínhamos acesso ao efeito da oclusão bilateral da artéria carótida comum nas variáveis cardioventilatórias. Encontra-se inserida uma representação diagramática do corpo carotídeo e das estruturas anatómicas relacionadas. O local da oclusão está indicado.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efeito da idade nas respostas ventilatórias induzidas pelas OCCs

A OCC bilateral conduziu a um efeito excitatório na ventilação: na Figura 5.2. podem ver-se traçados originais ilustrativos.

A isquemia carotídea causada pela OCC bilateral durante 5, 10 e 15 s conduziu a um efeito excitatório em todos os componentes da ventilação, dependente da duração da OCC (Figura 5.3.), o que está de acordo com o descrito previamente (Monteiro & Ribeiro, 1989). O aumento do V_E resultou tanto de um aumento na f_R como de um aumento no V_T . Este efeito excitatório causado na ventilação pelo estímulo isquémico carotídeo encontrava-se preservado nos ratos velhos (Figura 5.3.) e totalmente abolido pela NSCX (Figura 5.5.).

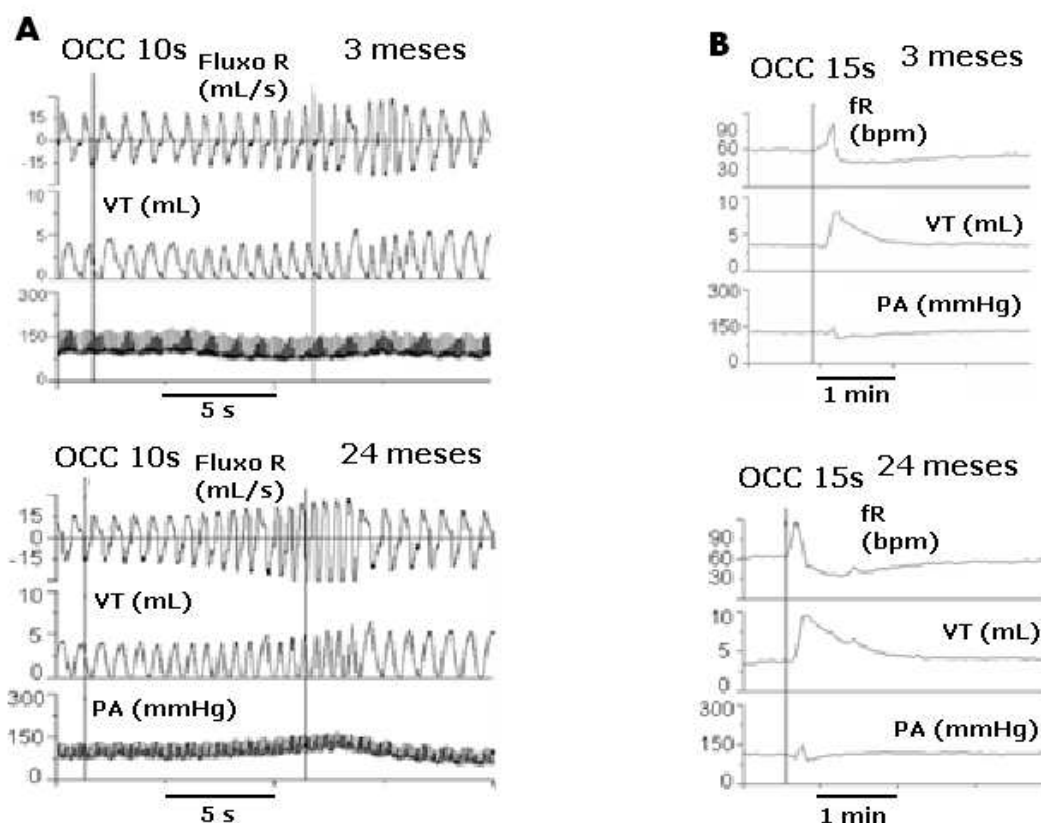


Figura 5.2. Alterações na ventilação durante as OCCs em ratos jovens e idosos

Traçados originais representativos do efeito das OCCs em ratos anestesiados e vagotomizados, respirando espontaneamente. A, Fluxo respiratório (Fluxo R; ml/sec), volume corrente (VT) e pressão arterial (PA) registados imediatamente antes e durante uma OCC de 10 s, em ratos de 3 e 24 meses. B, Frequência respiratória (f_R), volume tidal médio (VT) e pressão arterial média (PA) em ratos anestesiados e vagotomizados obtidos imediatamente antes e durante uma OCC de 15 s.

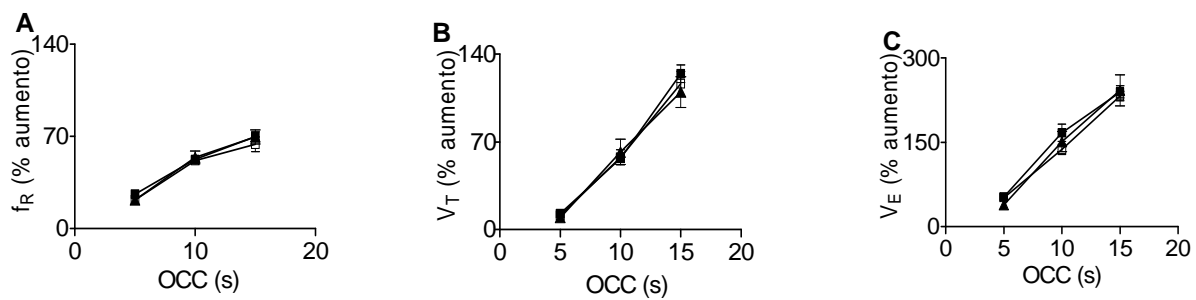


Figura 5.3. Efeito das OCCs nos parâmetros ventilatórios ao longo da idade

Efeito das OCCs na frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_T) e volume minuto respiratório (V_E) em ratos anestesiados e vagotomizados ao longo da idade. As curvas dose-resposta foram obtidas em 8-10 animais: (□) 3 meses, (▲) 12 meses e (■) 24 meses.

0 % de efeito corresponde para : f_R (ciclos min⁻¹), (□) $51,28 \pm 2,43$, (▲) $58,26 \pm 3,07$ e (■) $52,81 \pm 2,33$; V_T (mL Kg⁻¹), (□) $8,69 \pm 0,54$, (▲) $6,82 \pm 0,39$ e (■) $6,31 \pm 0,34$; V_E (mL min⁻¹ kg⁻¹), (□) $462,20 \pm 28,70$, (▲) $362,80 \pm 21,62$ e (■) $304,00 \pm 22,70$. Os dados representam média \pm S.E.M..

5.3.2 Efeito da idade nas respostas cardiovasculares induzidas pelas OCCs

Foi observado um aumento transitório da PA durante as OCCs (Figura 5.4.A e 5.4.B), seguida nalguns animais por uma diminuição também transitória no final da OCC: diminuições de $16,9 \pm 2,2$, $10,1 \pm 2,6$ e $28,3 \pm 2,1$ % respectivamente em animais de 3, 12 e 24 meses para OCCs com a duração de 15 s. Não foram detectadas alterações na FC durante as OCCs nos três grupos de animais.

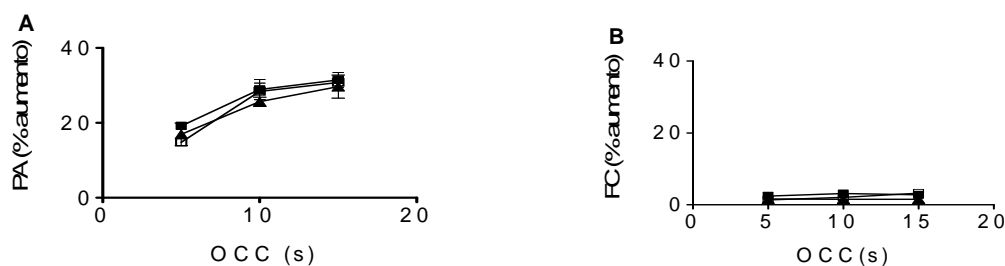


Figura 5.4. Efeito das OCCs nos parâmetros cardiovasculares ao longo da idade

Efeito das OCCs na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em ratos anestesiados e vagotomizados ao longo da idade. As curvas dose-resposta foram obtidas em 8-10 animais: (□) 3 meses, (▲) 12 meses e (■) 24 meses.

0 % de efeito corresponde para : FC (batimentos min⁻¹), (□) $403,3 \pm 6,59$, (▲) $349,4 \pm 16,99$ e (■) $348,9 \pm 16,53$; PA (mmHg), (□) $110,2 \pm 6,09$, (▲) $85,37 \pm 3,25$ e (■) $88,00 \pm 3,15$. Os dados representam média \pm S.E.M..

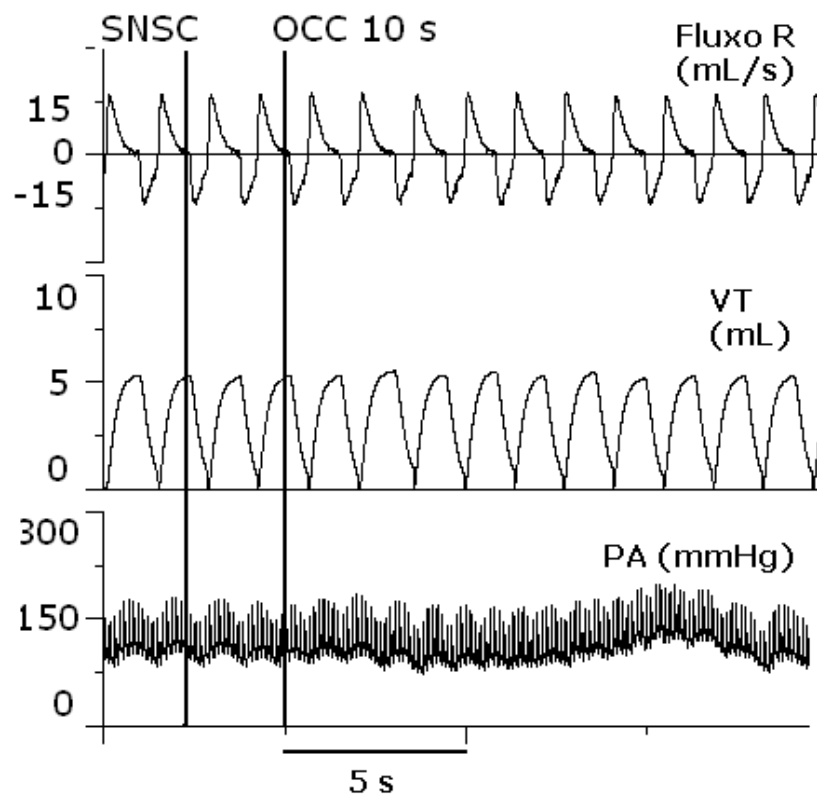


Figura 5.5. Teste da secção dos nervos do seio carotídeo

Raw *data* de uma experiência única numa rato de 3 meses anestesiado e respirando espontaneamente, mostrando o efeito de uma OCC de 10s na pressão arterial (PA em mmHg) e ventilação (fluxo respiratório em mL/s; volume corrente em mL), antes e após a secção bilateral do nervo do seio carotídeo (SNSC). O 1º traço vertical indica o momento da SNSC, e o 2º traço vertical indica o momento da OCC. Após a SNSC, os efeitos da OCC na ventilação são anulados, mantendo-se o efeito cardiovascular.

5.4 DISCUSSÃO

A abordagem funcional da actividade quimiorreceptora do corpo carotídeo, utilizando as respostas ventilatórias à isquemia carotídea, mostrou que aparentemente o controlo periférico da ventilação não se deteriora com a idade. Os resultados descritos no presente capítulo são consistentes com a ausência de alterações no controlo periférico das respostas ventilatórias à hipoxia analisadas em humanos idosos e saudáveis, e apoiam estudos prévios em humanos que sugerem que as alterações estruturais e neuroquímicas causadas pelo envelhecimento a nível do corpo carotídeo são compensadas a nível do corpo carotídeo como um todo e/ou a nível do SNC. Aparentemente, isto é operado a nível do corpo carotídeo, provavelmente envolvendo as células tipo II porque, em particular, o envelhecimento aumenta o tecido conjuntivo e as células tipo II de modo semelhante ao que é encontrado na doença pulmonar crónica (Porzionato *et al.*, 2005), e como estas células são consideradas células pluripotenciais, este facto poderia explicar a manutenção da função do corpo carotídeo.

A hiperventilação induzida pela breve (≤ 15 s) oclusão bilateral da artéria carótida comum em adultos jovens é abolida pela secção do NSC (Monteiro & Ribeiro, 1989), constituindo um modelo alternativo à hipoxia para estudar a actividade quimiossensora *in vivo*. No presente trabalho demonstrámos que em idosos as respostas às OCCs também eram abolidas pela secção do NSC. Estes efeitos nos quimiossensores do corpo carotídeo têm sido interpretados como sendo uma consequência da queda na pressão intrasínusal e redução do fluxo sanguíneo no corpo carotídeo (Monteiro & Ribeiro, 1989). O aumento transitório da PA observado durante a OCC resulta da inibição da actividade dos baroreceptores causada pela queda transitória da pressão intrasínusal. Neste modelo experimental, a magnitude deste efeito na PA pode vir reduzida pelo estiramento das artérias carótidas comuns, e é seguido de um período de hipotensão ao terminar a oclusão.

No presente trabalho, os efeitos da idade nos reflexos cardiorespiratórios induzidos pela isquémia carotídea não mostraram diferenças em relação aos ratos jovens. Um trabalho recente também realizado em ratos de 3 e 24 meses estudou as consequências da isquemia carotídea (pela oclusão permanente da artéria carótida direita) no balanço oxidativo cerebral (Macri *et al.*, 2010).

Tratava-se de uma isquemia de longa duração, e os autores não avaliaram os efeitos da isquemia carotídea nos reflexos ventilatórios ao longo da idade, os quais foram demonstrados pela primeira vez no nosso estudo. A função baroreflexa do seio carotídeo no envelhecimento nunca foi estudada neste modelo, mas está descrito em ratos Fisher anestesiados que a função baroreflexa carotídea se mantém nos animais de idade avançada (Wei *et al.*, 1986). Nos humanos também não há diferença na actividade baroreflexa carotídea ao longo da idade (Fiocchi *et al.*, 1985; Shi *et al.*, 1996).

Em conclusão, os nossos resultados demonstraram que as OCCs produzem aumento da ventilação dependente do corpo carotídeo, sendo a resposta ventilatória proporcional ao tempo de duração das OCCs, mantendo-se estas características ao longo da idade.

VI CAPÍTULO

EFEITO DA IDADE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À DOPAMINA MEDIADA PELO CORPO CAROTÍDEO

6 EFEITO DA IDADE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À DOPAMINA MEDIADA PELO CORPO CAROTÍDEO

6.1 INTRODUÇÃO

A dopamina, sendo o neurotransmissor mais abundante na sinapse sensitiva do corpo carotídeo (Gonzalez *et al.*, 1994), administrada exogenamente é utilizada com fins terapêuticos, nomeadamente em situações de choque (Dellinger *et al.*, 2008). Tem efeitos inibitórios na ventilação em repouso e durante a exposição à hipoxia, mediados por receptores D₂ de dopamina localizados no corpo carotídeo (Zapata & Zuazo, 1980; Nishino & Lahiri, 1981; Huey *et al.*, 2000; Huey & Powell, 2000; Vicario *et al.*, 2000; Prabhakar, 2006; Vincent *et al.*, 2007). Os receptores D₂ de dopamina também estão presentes nas regiões do cérebro associadas ao controlo da ventilação, incluindo o *nucleus tractus solitarius* (Huey *et al.*, 2000; Huey & Powell, 2000; Kline *et al.*, 2002; Vincent *et al.*, 2007).

Explicou-se na Introdução Geral que a função dopaminérgica diminui com a idade, nomeadamente encontra-se documentado que estes receptores diminuem em todas as regiões do cérebro como parte do processo normal de envelhecimento (Inoue *et al.*, 2001).

Existem poucos dados disponíveis respeitantes aos efeitos do envelhecimento nos receptores D₂ de dopamina do corpo carotídeo. Num estudo *in vitro* em corpos carotídeos de rato, e ao longo da idade, apurou-se que: o conteúdo em dopamina aumenta; a libertação basal de catecolaminas em condições de normoxia não se altera; a estimulação hipóxica dos quimorreceptores conduz a uma ligeira diminuição das catecolaminas nos ratos de 12 meses e mais velhos, levando a pensar que as células quimiorreceptoras vão ficando hipofuncionais durante o envelhecimento (Conde *et al.*, 2006b).

Objectivos

O objectivo deste capítulo foi testar a hipótese de que a resposta ventilatória da dopamina mediada pelo corpo carotídeo diminua com a idade. Esta investigação foi levada a cabo *in vivo*, em ratos anestesiados de 3 e 24 meses, medindo a ventilação espontânea resultante da administração de bolus de dopamina. O papel dos corpos carotídeos foi testado usando um rato com secção bilateral do NSC por cada grupo etário utilizado.

Ao longo destes estudos, os protocolos incluíram a administração de infusões de domperidona, um antagonista dos receptores D₂ de dopamina: a domperidona, sendo um fármaco que não passa a BHE (Baudry *et al.*, 1979), permite

conclusões sobre a influência do sistema dopaminérgico periférico nas respostas ventilatórias e permite inferir indirectamente se o número de receptores de dopamina activos em condições basais se modificou.

Os resultados obtidos no presente trabalho também contribuem para investigar se é de esperar no idoso a mesma magnitude das respostas cardiorespiratórias induzidas pela administração de dopamina com fins terapêuticos (choque)

.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram realizadas em ratos macho Wistar com 3 ($461,5 \pm 11,4$ g; $n=10$), 12 ($635,4 \pm 18,42$ g; $n=10$) e 24 meses ($653,3 \pm 21,7$ g; $n=10$), anestesiados e vagotomizados.

A infusão de soro fisiológico ou de domperidona (antagonista dos receptores D_2 de dopamina; Sigma-RBI Chemical, Portugal) foi efectuada via veia femoral. Nestes animais procedia-se também à remoção do osso hióide para expor a artéria carótida externa direita posteriormente canulada (Cateter Stériflex 30 cm 167.07, 0,3 a 0,7 mm; Vygon, Maia, Portugal) para administração de bolus de dopamina (Medopa; Medinfar, Portugal).

Os bolus de dopamina foram injectados num volume de 0,1 mL, lavado com 0,2 mL de cloreto de sódio aquoso a 0,9 %; na ausência (apenas sob uma infusão de soro fisiológico) ou na presença de uma infusão de domperidona. As infusões I.V. foram realizadas com a velocidade de 0.5 mL min^{-1} durante três minutos (seringa infusora B. Braun).

Em cada rato eram realizadas:

- Três curvas dose-efeito cumulativas para a dopamina: bolus I.C. após 3 minutos de infusão com soro fisiológico, o veículo do fármaco utilizado como antagonista dos receptores D_2 de dopamina (domperidona);
- Três curvas dose-efeito cumulativas para a dopamina: bolus I.C. após 3 minutos de infusão de domperidona. Apenas uma dose de domperidona foi testada por animal. Os intervalos entre as injecções de fármacos ou de infusões foi, pelo menos, de 5 min. Os valores de controlo da f_R , V_T , PA e FC corresponderam ao valor médio medido no período de vinte e cinco segundos imediatamente antes da administração do fármaco. Após a administração I.C. do fármaco, os valores de f_R , V_T , PA e FC considerados corresponderam ao efeito máximo medido durante o período de vinte e cinco segundos que se seguia às injecções, e foram comparados com os controlos. O efeito máximo induzido pelas injecções de dopamina ocorreu sempre durante os primeiros vinte e cinco segundos que se seguiram após o final das injecções.

Para confirmar que o efeito da dopamina foi mediado pelos quimiorreceptores do corpo carotídeo, repetiu-se o protocolo da experiência num rato com denervação dos corpos carotídeos através da secção bilateral do NSC.

Na Figura 6.1. mostra-se uma ilustração esquemática dos dispositivos usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios em ratos anestesiados e

respirando espontaneamente. Para uma descrição mais pormenorizada, consultar capítulo geral dos métodos (Capítulo 2).

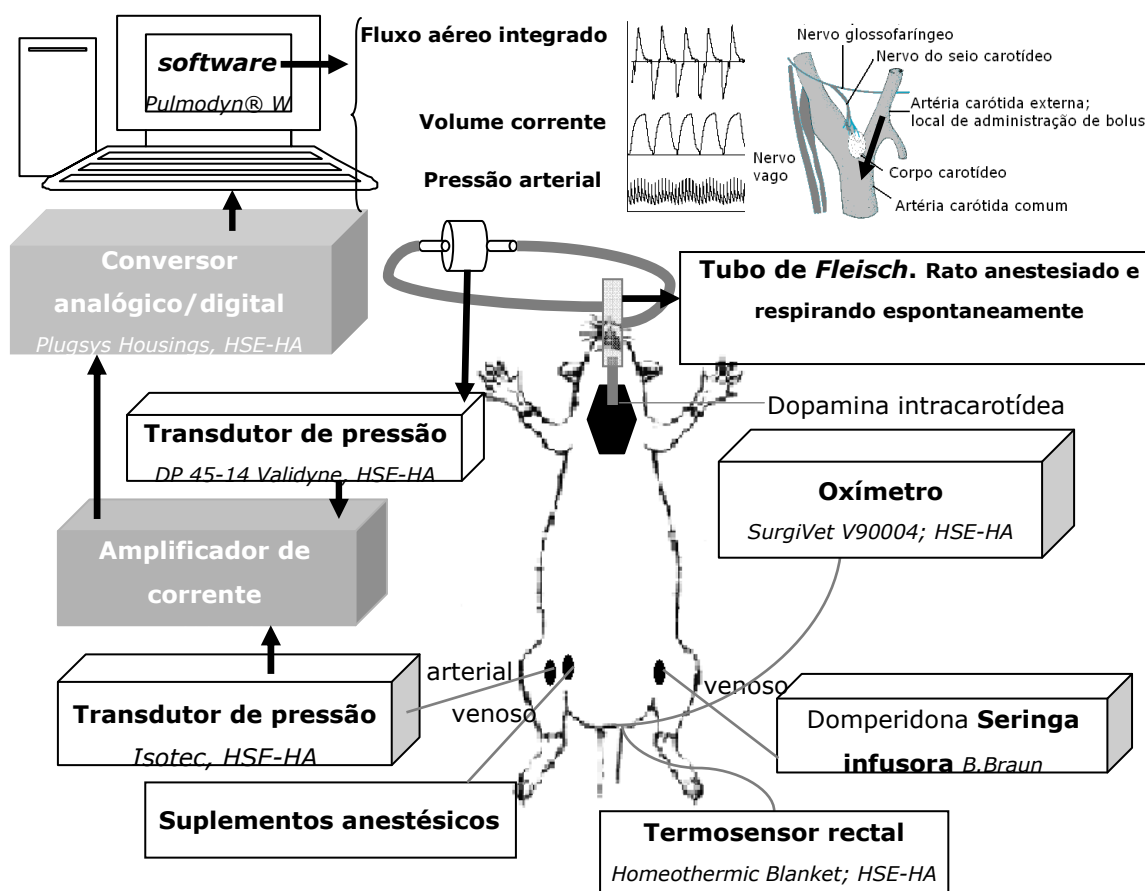


Figura 6.1. Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios

Os ratos eram anestesiados, vagotomizados e respiravam espontaneamente. Deste modo tínhamos acesso ao efeito dos bolus I.C. de dopamina na ausência e na presença da infusão de domperidona, um antagonista dos receptores D2 de dopamina.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Efeito dos bolus de dopamina na ventilação ao longo da idade

Na Figura 6.2. encontram-se exemplos de traçados originais ilustrando a diminuição dos parâmetros ventilatórios após a administração dum bolus de dopamina (30 nmol, I.C.) num rato de 3 meses e noutro de 24 meses.

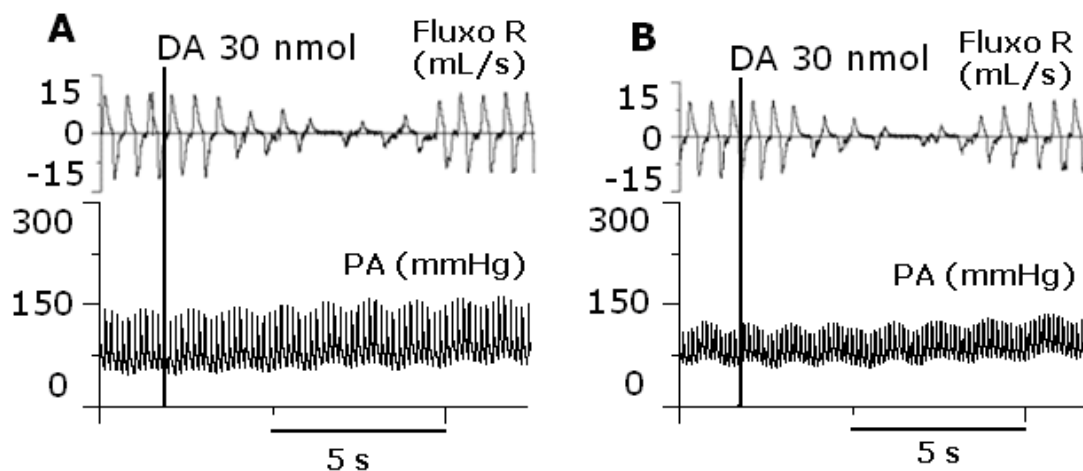


Figura 6.2. Comparação dos efeitos da dopamina na ventilação e na PA num animal jovem e num idoso

Traçados exemplificativos de uma experiência única demonstrando as respostas cardioventilatórias a bolus de dopamina 30 nmol em ratos de 3 (A) e 24 meses (B), em ratos anestesiados e vagotomizados, respirando espontaneamente.

As curvas dose-resposta para os efeitos dos bolus I.C. de dopamina (3-100 nmol) nos parâmetros ventilatórios em animais anestesiados e vagotomizados estão representados na Figura 6.3. O efeito inibitório da dopamina na ventilação era dose-dependente e da mesma magnitude em ratos jovens e ratos envelhecidos.

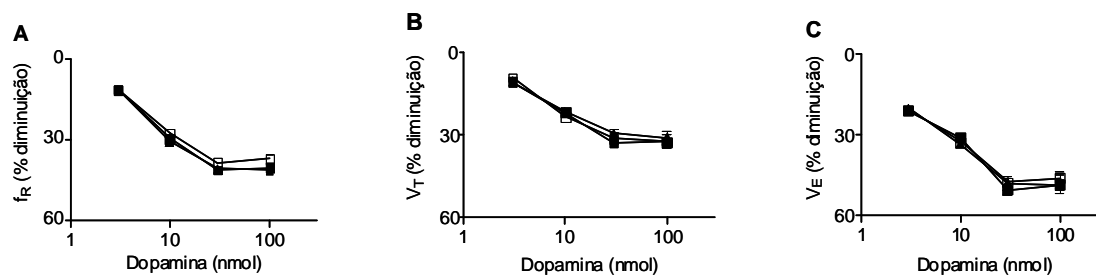


Figura 6.3. Efeito da idade nas respostas ventilatórias à administração de dopamina

Efeitos da administração cumulativa de bolus I.C. de dopamina na frequência respiratória (fR), volume tidal (VT) e volume minuto respiratório (VE) em ratos anestesiados e vagotomizados ao longo da idade. (□) 3 meses (n=10), (▲) 12 meses (n=10) e (■) 24 meses (n=10). 0 % de efeito corresponde para : fR (ciclos min⁻¹), (□) $49,75 \pm 1,20$, (▲) $52,26 \pm 1,46$ e (■) $47,49 \pm 1,55$; VT (mL Kg⁻¹), (□) $8,78 \pm 0,34$, (▲) $6,04 \pm 0,29$ e (■) $6,96 \pm 0,35$; VE (mL min⁻¹ kg⁻¹), (□) $442,50 \pm 24,23$, (▲) $316,40 \pm 12,39$ e (■) $326,00 \pm 16,96$. Os dados representam média \pm S.E.M..

Os efeitos respiratórios da dopamina foram abolidos pela NSCX bilateral (Figura 6.4.).

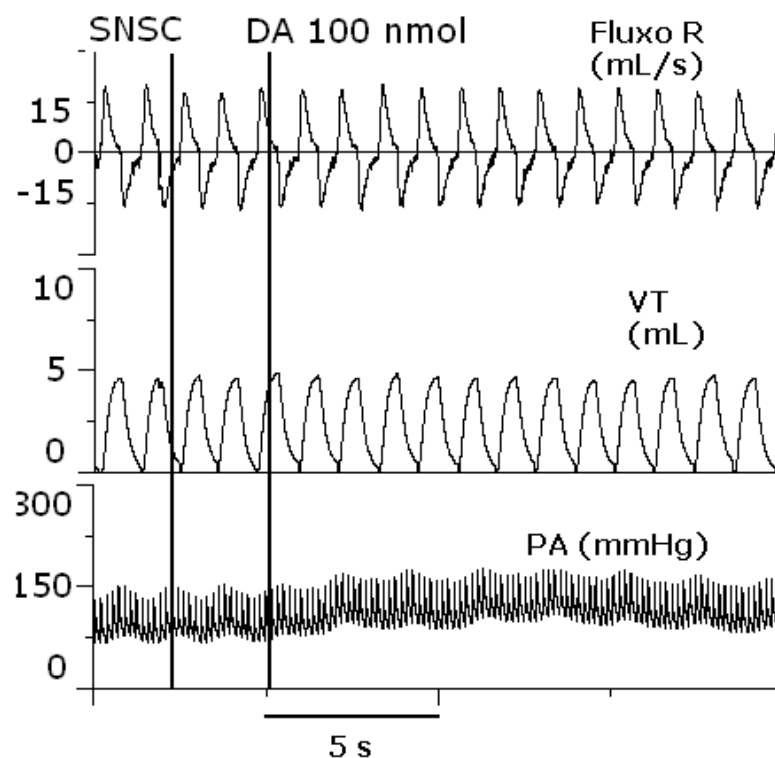


Figura 6.4. Teste da secção dos nervos do seio carotídeo

Raw data de uma experiência única numa rato de 24 meses anestesiado e respirando espontaneamente, mostrando o efeito de um bolus de dopamina 100 nmol na pressão arterial (PA em mmHg) e ventilação (fluxo respiratório em mL/s; volume corrente em mL), antes e após a secção bilateral do nervo do seio carotídeo (SNSC). O 1º traço vertical indica o momento da SNSC, e o 2º traço vertical indica o momento do bolus de dopamina. Após a SNSC, os efeitos da adenosina na ventilação são anulados, mantendo-se o efeito cardiovascular

6.3.2 Efeito dos bolus de dopamina nas variáveis cardiovasculares ao longo da idade

Nas condições experimentais do presente trabalho a FC não varia após os bolus de dopamina, mas a PA aumenta de um modo dependente da dose, atingindo uma resposta máxima de 30 % para a dose de 100 nmol de dopamina. O efeito dos bolus de dopamina nas variáveis cardiovasculares manteve o mesmo padrão nos ratos velhos.

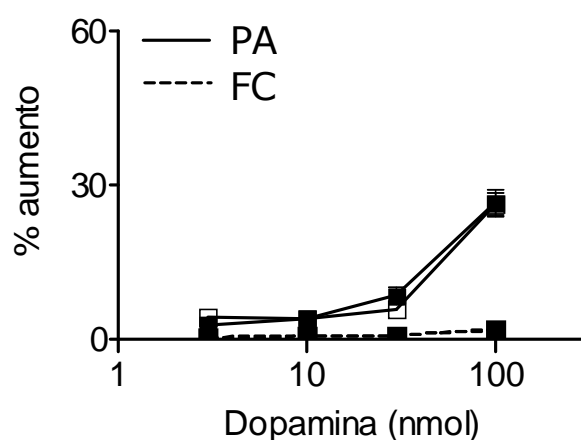


Figura 6.5. Comparação entre os efeitos cardiovasculares da dopamina em ratos jovens e idosos

Efeitos da administração cumulativa de bolus I.C. de dopamina na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em ratos anestesiados e vagotomizados ao longo da idade: (□) 3 meses (n=10) e (■) 24 meses (n=10). 0 % de efeito corresponde para : FC (batimentos min^{-1}), (□) $360,30 \pm 12,80$ e (■) $312,40 \pm 5,79$; PA (mmHg), (□) $111,40 \pm 4,76$ e (■) $82,34 \pm 3,73$. Os dados representam média \pm S.E.M..

6.3.3 Efeitos na ventilação dos bolus de dopamina na presença de domperidona ao longo da idade

O efeito da dopamina nos parâmetros ventilatórios foi testado na presença de domperidona com o objectivo de estudar uma eventual modificação na contribuição dos receptores D_2 para as respostas ventilatórias à dopamina no envelhecimento. A infusão I.V. de domperidona nas doses de $0.01\text{-}0.5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ praticamente aboliu a depressão no V_E induzida pela dopamina (Figura 6.6). O antagonismo foi dose dependente e da mesma magnitude em ratos de 3, 12 e 24 meses (Figura 6.6.).

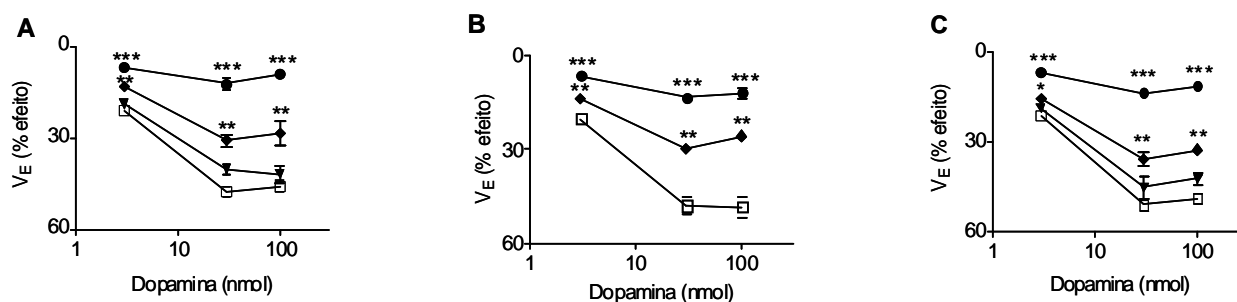


Figura 6.6. Efeito do antagonismo dos receptores D_2 nas respostas ventilatórias à dopamina em animais jovens e idosos

Curvas dose-resposta cumulativas para os efeitos da administração de bolus de dopamina I.C. no volume minuto respiratório (V_E) em ratos anestesiados e vagotomizados na ausência e na presença de infusões de domperidona, ao longo da idade. (A) ratos com 3 meses, (B) ratos com 12 meses e (C) ratos com 24 meses. (\square) Na ausência de domperidona ($n=13-20$); e na presença de infusão I.V. de domperidona ($n=8$) (\blacktriangledown) $0,01 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; (\blacklozenge) $0,1 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; (\bullet) $0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. 0 % de efeito no V_E ($\text{mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) corresponde aos seguintes valores: (A) $550,20 \pm 24,30$ (\blacktriangledown), $757,10 \pm 52,97$ (\blacklozenge) e $589,80 \pm 154,90$ (\bullet); (B) $373,80 \pm 26,32$ (\blacktriangledown), $432,00 \pm 44,26$ (\blacklozenge) e $368,70 \pm 42,96$ (\bullet); (C) $351,20 \pm 31,01$ (\blacktriangledown), $400,80 \pm 25,69$ (\blacklozenge) e $381,10 \pm 42,63$ (\bullet). Os dados representam média \pm S.E.M., * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$, Mann-Whitney U-test.

6.3.4 Efeitos cardiovasculares da dopamina na presença de domperidona

Ao contrário dos efeitos nos parâmetros ventilatórios, a domperidona ($0,01-0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) não modificou os efeitos da dopamina na FC e na PA, quer em ratos jovens, quer em ratos envelhecidos (Figura 6.7).

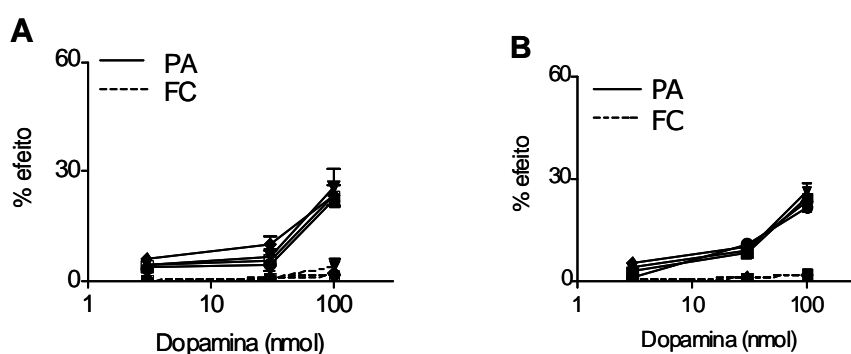


Figura 6.7. Efeito do antagonismo dos receptores D_2 nas respostas cardiovasculares à dopamina em animais jovens e idosos

Curvas dose-resposta cumulativas para os efeitos da administração de bolus de dopamina I.C. na frequência cardíaca (FC) e na pressão arterial (PA) em ratos anestesiados e vagotomizados na ausência e na presença de infusões de domperidona, ao longo da idade. (A) ratos com 3 meses e (B) ratos com 24 meses. (\square) Na ausência de domperidona ($n=13-20$); e na presença de infusão de domperidona I.V. ($n=8$) (\blacktriangledown) $0,01 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; (\blacklozenge) $0,1 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; (\bullet) $0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. 0 % de efeito no FC (batimentos min^{-1}) corresponde aos seguintes valores: (A) $339,40 \pm 6,83$ (\blacktriangledown), $363,50 \pm 33,67$ (\blacklozenge) e $339,50 \pm 27,32$ (\bullet); (B) $282,20 \pm 12,08$ (\blacktriangledown), $282,90 \pm 6,23$ (\blacklozenge) e $297,30 \pm 7,50$ (\bullet); e na TA (mmHg) corresponde aos seguintes valores: (A) $98,15 \pm 6,78$ (\blacktriangledown), $112,50 \pm 11,28$ (\blacklozenge) e $98,53 \pm 1,28$ (\bullet); (B) $83,07 \pm 3,25$ (\blacktriangledown), $86,21 \pm 8,73$ (\blacklozenge) e $78,42 \pm 4,89$ (\bullet). Os dados representam média \pm S.E.M., * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$, Mann-Whitney U-test.

6.3.5 Efeitos cardioventilatórios da domperidona

Os efeitos da infusão de domperidona ($0,01$ - $0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) *per si*, na ausência de dopamina exógena, no V_E , FC e PA em ratos de 3 e 24 meses de idade estão ilustrados na figura 6.8.

A domperidona sozinha causou aumentos estatisticamente significativos no V_E basal, tanto nos ratos jovens como nos envelhecidos de uma forma dose-dependente, sendo o efeito excitatório do antagonista D_2 de dopamina na ventilação atenuado de modo significativo ($p < 0,01$) nos animais envelhecidos (Figura 6.8. A). O efeito excitatório máximo ($66,8 \pm 8,1 \%$) foi atingido com $0,1 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nos animais jovens. A dose mais elevada ($0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) causou um efeito excitatório menos pronunciado na ventilação ($44,3 \pm 12,9 \%$). Aparentemente a domperidona nas doses mais reduzidas ($0,01$ e $0,1 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) por si só não causou modificações na FC e PA. Na dose de $0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ foi observado um aumento estatisticamente significativo ($20,7 \pm 3,9 \%$) da PA nos ratos envelhecidos.

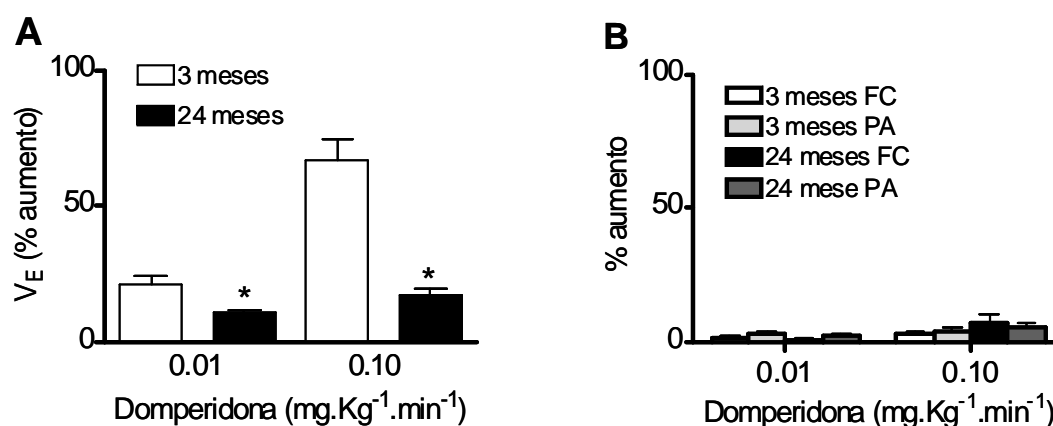


Figura 6.8. Efeito da infusão de domperidona nos parâmetros cardioventilatórios de ratos jovens e envelhecidos

Os efeitos da infusão I.V. de domperidona ($0,01$ - $0,1 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) no (A) volume minuto respiratório (V_E), e (B) frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em ratos anestesiados e vagotomizados de 3 e 24 meses de idade ($n=6$). Apenas uma dose foi testada por animal. 0 % de efeito corresponde aos valores mostrados nas figuras 6.3. e 6.5.. Os dados representam média \pm S.E.M., * $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test comparando ratos de 3 e 24 meses.

6.4 DISCUSSÃO

Este estudo foi iniciado para investigar se o envelhecimento modificava as repostas ventilatórias à dopamina no nosso modelo de rato anestesiado, vagotomizado e respirando espontaneamente.

Os resultados obtidos no presente trabalho com dopamina exógena e manipulando os seus efeitos endógenos com a utilização de antagonista da dopamina, mostraram que os receptores de dopamina não estão deteriorados de modo significativo nos animais envelhecidos. No entanto, o facto do efeito excitatório basal da domperidona na actividade do corpo carotídeo se revelar menor nos ratos velhos, deverá ser resultado da diminuição do número de receptores D_2 de dopamina com envelhecimento.

A dopamina foi escolhida para ser testada neste modelo porque esta molécula é o mediador melhor caracterizado no corpo carotídeo, tem indicações terapêuticas específicas na prática clínica e existem evidências prévias *in vitro* indicando que a função dopaminérgica no corpo carotídeo está alterada com o envelhecimento.

Os resultados actuais demonstraram que o efeito inibitório da dopamina na ventilação (afectando ambos os constituintes do padrão respiratório), não apresenta diferenças entre os animais de 3 e 24 meses (Figura 6.2. e 6.3.). Estes efeitos da dopamina eram mediados através dos quimiorreceptores do corpo carotídeo, uma vez que estas acções desapareceram após a secção bilateral do NSC (Figura 6.4.).

Apesar da dopamina exógena não atravessar a BHE, a inibição causada pela dopamina na ventilação foi obtida em ratos com secção bilateral dos nervos vagos, excluindo a hipótese desses efeitos na ventilação poderem depender da integridade dos vagos. Mais ainda, tal como já estava previamente descrito, não há diferenças marcadas entre o efeito da dopamina em ratos com nervos vagos intactos ou seccionados (McQueen *et al.*, 1998).

A dopamina, o neurotransmissor mais exaustivamente estudado e melhor caracterizado do corpo carotídeo, é libertado especificamente pelas células tipo I em resposta à hipoxia, mas os seus efeitos funcionais na actividade do NSC e ventilação são principalmente inibitórios. Mais ainda, as situações clínicas associadas com insuficiência cardíaca são mais prevalentes no idoso, e os efeitos cardiorespiratórios da dopamina exógena nos idosos e animais envelhecidos nunca foram investigados.

A observação dos efeitos depressores ventilatórios da dopamina exógena mediados pelo corpo carotídeo, no presente estudo, são consistentes com os obtidos previamente em animais jovens (Cardenas & Zapata, 1981; O'Halloran *et al.*, 1998; Carroll *et al.*, 2005), e em seres humanos (Welsh *et al.*, 1978), e ficou demonstrado pela primeira vez que este efeito inibitório é da mesma magnitude nos animais envelhecidos.

O efeito da dopamina na ventilação é mediado através de receptores D_2 de dopamina, uma vez que este efeito foi prevenido pela domperidona, um antagonista selectivo dos receptores D_2 de dopamina que não atravessa a barreira hematoencefálica (Baudry *et al.*, 1979; Kohli *et al.*, 1983; Mir *et al.*, 1984).

A domperidona administrada sozinha aumentou o V_E basal, tal como já descrito em trabalhos prévios (Lahiri *et al.*, 1984; Javaheri & Guerra, 1990; Gamboa *et al.*, 2003). O facto de nos animais idosos o efeito excitatório da domperidona no V_E estar muito reduzido, significa que o efeito inibitório basal da dopamina na actividade do corpo carotídeo é menor nos ratos velhos, provavelmente como resultado da diminuição do número de receptores D_2 com a idade ou por diminuição da libertação basal de dopamina. Experiências prévias *in vitro*, e apesar do corpo carotídeo de ratos velhos ter maior conteúdo e concentração de dopamina que o órgão de controlo dos ratos de 3 meses, não se observam diferenças entre a libertação basal de catecolaminas (maior parte dopamina) em condições de normoxia nos ratos jovens e envelhecidos (Conde *et al.*, 2006b). Assim, o efeito da domperidona, por ela própria, descrito no presente trabalho sugere que a eventual diminuição na densidade dos receptores D_2 de dopamina no corpo carotídeo será inferior às diminuições descritas para o estriado em animais velhos. Outra interpretação possível é admitir que a idade altera a conformação dos receptores de dopamina e consequentemente a sua afinidade para a domperidona.

A resposta da PA desencadeada pela dopamina, ou seja um curto aumento seguido de um retorno à linha de base, ocorreu independentemente da NSCX e bloqueio dos receptores D_2 de dopamina. Este resultado garante que a resposta hipertensiva imediata evocada pelo desafio da dopamina ocorre independentemente dos aferentes dos barorreceptores, e provavelmente dependerá dos receptores D_1 de dopamina cardíacos ou de adrenoceptores. A domperidona, *per si*, não induziu uma alteração significativa nos parâmetros

cardiovasculares, à excepção da dose $0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ com a qual foi observado um aumento estatisticamente significativo ($20.7 \pm 3.9 \%$) da PA nos ratos envelhecidos. Este efeito das diferentes doses está de acordo com um estudo em pessoas jovens e idosos em que a domperidona ($0,3 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) administrada sozinha não modificou de modo significativo a FC e a PA tanto sistólica como diastólica (Mercuro *et al.*, 1987). Já a dose de $0,5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ administrada em cães (Taylor *et al.*, 1983) e pessoas (Samuels *et al.*, 2007), jovens, aumenta a PA devido ao antagonismo de receptores D_2 de dopamina inibitórios da libertação de noradrenalina, localizados presinápticamente nas terminações nervosas adrenérgicas.

Introduzida como medicamento no final dos anos 60, a dopamina tornou-se o fármaco vasoactivo mais usado nas unidades de cuidados intensivos, estando assumido um aumento da sobrevida no choque séptico e cardiogénico (Goldberg, 1974).

Tem sido demonstrado que a dopamina degrada a resposta ventilatória à hipoxemia, e provavelmente também à hipercapnia, por deprimir o corpo carotídeo (van de Borne *et al.*, 1998). Nos doentes com ventilação mecânica invasiva, a depressão da ventilação pela dopamina não impõe um problema clínico relevante. Contudo, estes problemas podem surgir aquando do retirar do suporte mecânico ventilatório, dado que a dopamina em baixas doses diminui o desconforto consciente desencadeado pela hipoxemia e hipercapnia arteriais (van de Borne *et al.*, 1998). Portanto, quando um doente está progressivamente a ser desconectado do suporte ventilatório sob medicação com dopamina, ele pode não ser capaz de dar ao médico um *feedback* sintomático importante acerca das trocas gasosas que não se estarão a fazer de modo adequado (van de Borne *et al.*, 1998; Johnson, Jr., 1998). Apesar da falta de evidências científicas para os seus presumíveis benefícios, a dopamina é ainda hoje de primeira escolha como fármaco vasoactivo, com os seus efeitos dopaminérgicos bem como α e β adrenérgicos: nas últimas *guidelines* internacionais para o tratamento da sépsis grave e choque séptico (Dellinger *et al.*, 2008), o uso de vasopressores para manter a PAM $\geq 65 \text{ mmHg}$ indicam a dopamina ou a noradrenalina administradas por catéter central como o vasopressor inicial de escolha.

Concluindo, os nossos resultados demonstraram que a nível do corpo carotídeo o tonus dopaminérgico endógeno inibitório está diminuído nos animais envelhecidos. Contudo, a depressão ventilatória causada pela dopamina

endógena está preservada nos animais mais velhos, o que deve ser tomado em consideração aquando do seu uso nas unidades de cuidados intensivos, e particularmente nas situações de desconexão da ventilação mecânica.

VII CAPÍTULO

EFEITO DA IDADE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA À ADENOSINA MEDIADA PELO CORPO CAROTÍDEO

7 EFEITO DA IDADE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA À ADENOSINA MEDIADA PELO CORPO CAROTÍDEO

7.1 INTRODUÇÃO

No capítulo anterior demonstrou-se que o efeito depressor da dopamina na ventilação mediado pelo corpo carotídeo não se altera com a idade. Neste capítulo iremos investigar o efeito da idade nas respostas a um neurotransmissor excitatório da actividade do corpo carotídeo.

Os receptores A_{2A} de adenosina no corpo carotídeo estão envolvidos na estimulação da ventilação em condições basais (McQueen & Ribeiro, 1986; Monteiro & Ribeiro, 1987; Koos & Chau, 1998; Xu *et al.*, 2006; Montandon *et al.*, 2007) e em resposta à hipoxia (Koos *et al.*, 2002; Conde & Monteiro, 2004; Xu *et al.*, 2006; Conde *et al.*, 2006c). Os receptores A_2 de adenosina caracterizados no corpo carotídeo incluem os subtipos A_{2B} e A_{2A} , localizados respectivamente pré e pós-sinapticamente (Conde *et al.*, 2006c).

O efeito da idade na adenosina e nos receptores de adenosina nunca foi estudado no corpo carotídeo. Noutras preparações encontramos descrições de aumento ou diminuição dos receptores de adenosina como consequência do envelhecimento (Cunha *et al.*, 1995; Popoli *et al.*, 1998a; Corsi *et al.*, 2000). A nível do *striatum* observa-se uma ligeira diminuição dos receptores de adenosina nos animais velhos, aparentemente sem consequências funcionais (Corsi *et al.*, 1999), e no coração de rato também foi descrita uma diminuição relacionada com a idade dos receptores A_1 e A_{2A} de adenosina (Jenner *et al.*, 2004). Por outro lado, em ratos velhos foi encontrado um aumento do número de receptores A_{2A} a nível do córtex límbico (Lopes *et al.*, 1999a) e do hipocampo (Rebola *et al.*, 2003; Diogenes *et al.*, 2007). A complexidade dos efeitos do envelhecimento no papel funcional da adenosina também é apoiado pela descoberta que o antagonismo dos receptores A_{2A} de adenosina a nível do *striatum* diminui o fluxo de glutamato em ratos jovens e, inversamente, aumenta em ratos envelhecidos (Corsi *et al.*, 2000).

O corpo carotídeo foi analisado em termos de respostas ventilatórias induzidas pela administração exógena de adenosina. Ao longo destes estudos, os protocolos incluíram a administração de infusões de SCH 58261, um antagonista dos dos receptores A_{2A} de adenosina.

Objectivos

O objectivo deste capítulo é testar a hipótese de que a estimulação do corpo carotideo pela adenosina se altera com a idade. Esta investigação foi levada a cabo *in vivo*, em ratos anestesiados de 3 e 24 meses, medindo a ventilação espontânea resultante da administração de bolus de adenosina.

Os resultados obtidos no presente trabalho também contribuíram para investigar se é de esperar no idoso a mesma magnitude das respostas cardiorespiratórias induzidas pela administração de adenosina com fins terapêuticos (taquicardia supraventricular).

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram realizadas em ratos machos Wistar com 3 (421.7 ± 6.3 g; $n=8$) e 24 meses (646.7 ± 16.3 g; $n=10$), anestesiados e vagotomizados.

A infusão de soro fisiológico ou de SCH 58261 ((7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazole-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c] pyrimidine; antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina; Sigma-RBI Chemical ;Portugal) foi efectuada via veia femoral. Nestes animais procedeu-se também à remoção do osso hióide para expor a artéria carótida externa direita posteriormente canulada (Cateter Stériflex 30 cm 167.07, 0,3 a 0,7 mm; Vygon, Maia, Portugal) para administração de bolus de adenosina (Adenocor; Sanofi-synthelabo, Portugal).

O protocolo experimental consistiu na administração de bolus de adenosina na artéria carótida comum direita utilizando um catéter introduzido através da artéria carótida externa ipsilateral, ficando a sua extremidade posicionada imediatamente abaixo da bifurcação. Os bolus de adenosina foram injectados num volume de 0.1mL, lavado com 0.2mL de cloreto de sódio aquoso a 0.9%; na ausência (apenas sob uma infusão de DMSO 0.4 mM ou 0.01%) ou na presença de uma infusão de SCH 58261. Estas administrações I.V. foram realizadas com seringa infusora através do cateter da veia femoral direita com a velocidade e a duração de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante três minutos.

Em cada rato foram realizadas:

- Três curvas dose-efeito cumulativas para a adenosina: bolus I.C. após 3 minutos de infusão com o veículo do fármaco antagonista da adenosina utilizado (SCH 58261), neste caso DMSO;
- Três curvas dose-efeito cumulativas para a adenosina: bolus I.C. após 3 minutos de infusão de SCH 58261. Apenas uma dose de SCH 58261 foi testada por animal. Os intervalos entre as injecções de fármacos ou de infusões foi, pelo menos, de 5 min. Os valores de controlo da f_R , V_T , PA e FC corresponderam ao valor médio medido no período de vinte e cinco segundos imediatamente antes da administração do fármaco. Após a administração I.C. do fármaco, os valores de f_R , V_T , PA e FA considerados corresponderam ao efeito máximo medido durante o período de vinte e cinco segundos que se seguiu às injecções, e foram comparados com os controlos. O efeito máximo induzido pelas injecções de adenosina ocorreu sempre durante os primeiros vinte e cinco segundos que se seguiram após o término das injecções.

Para confirmar que o efeito da adenosina foi mediado pelos quimiorreceptores do corpo carotídeo, realizou-se uma experiência controlo num rato com deservação dos corpos carotídeos através da secção bilateral do NSC, tal com descrito no II Capítulo.

Na Figura 7.1. mostra-se uma ilustração esquemática dos dispositivos usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios em ratos anestesiados e respirando espontaneamente. Para uma descrição mais pormenorizada, consultar capítulo geral dos métodos (Capítulo 2).

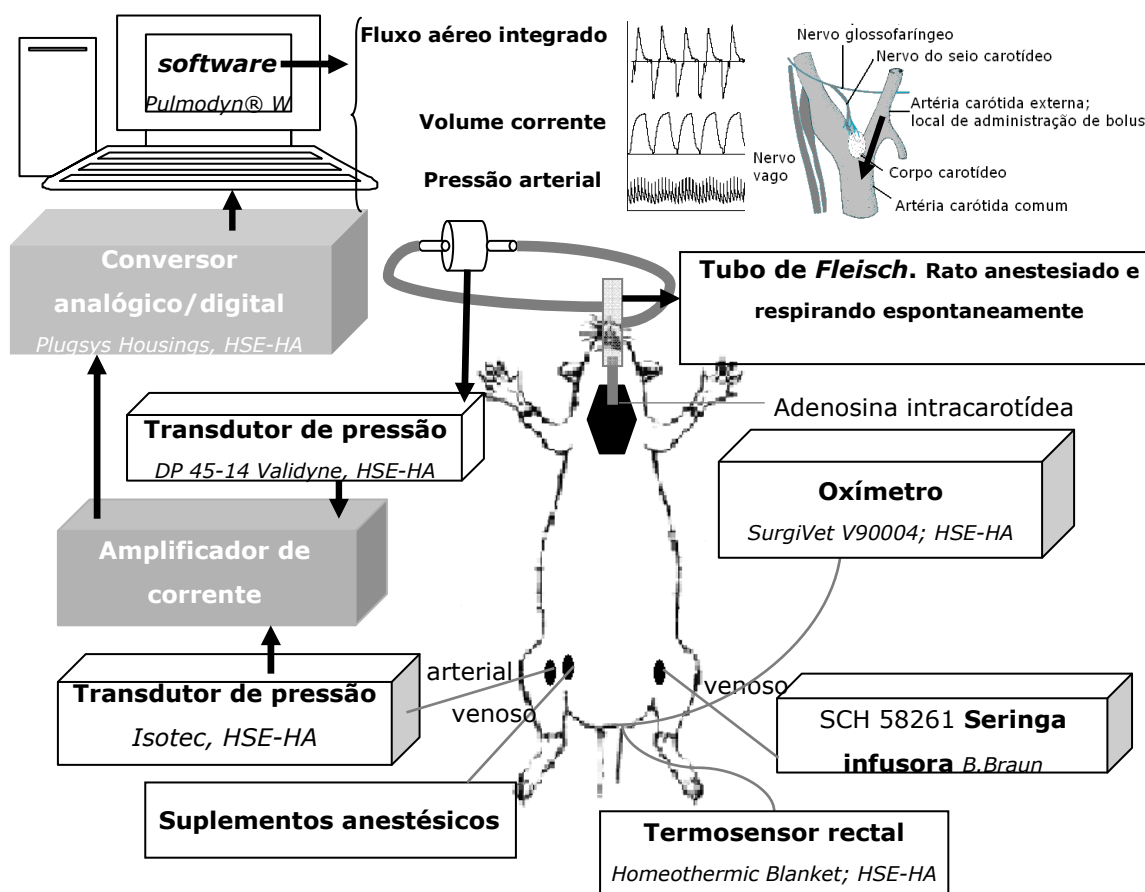


Figura 7.1. Ilustração esquemática dos dispositivos experimentais usados para o registo dos parâmetros cardioventilatórios

Os ratos eram anestesiados, vagotomizados e respiravam espontaneamente. Deste modo tínhamos acesso ao efeito dos bolus I.C. de adenosina na ausência e na presença da infusão de SCH 58261, um antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Efeitos cardioventilatórios da adenosina ao longo da idade

Os resultados obtidos nas experiências realizadas para investigar se o efeito excitatório da adenosina na ventilação foi modificado pela idade estão representados nas Figuras 7.2. e 7.3.

Na Figura 7.2. encontram-se exemplos de traçados originais ilustrando a estimulação dos parâmetros ventilatórios após a administração dum bolus de adenosina (30 nmol, I.C.) num rato de 3 meses e noutro de 24 meses.

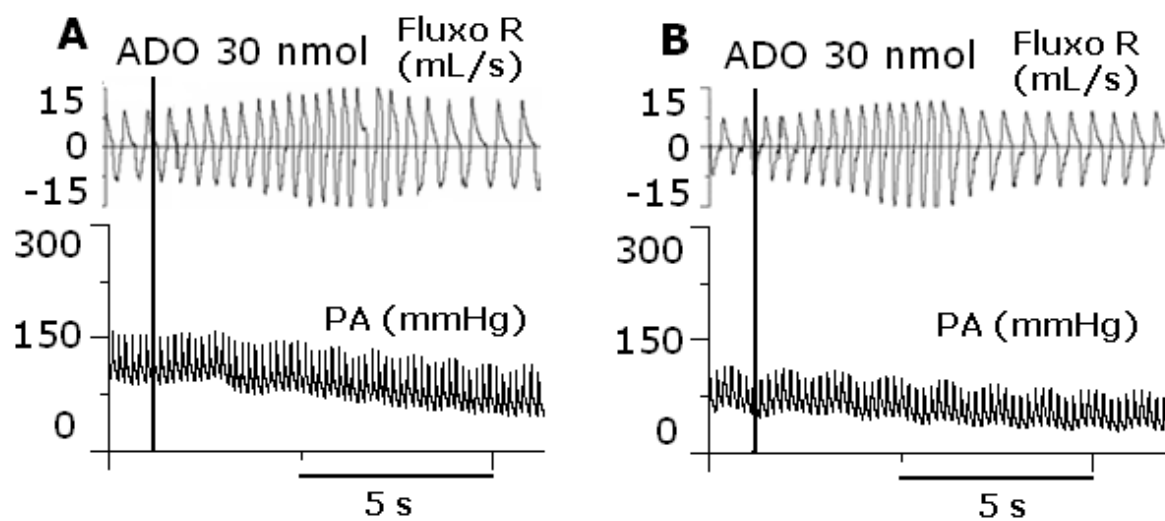


Figura 7.2. Exemplos de traçados originais ilustrando a resposta ventilatória aos bolus de adenosina

Traçados originais exemplificativos de uma experiência demonstrando a resposta ventilatória, fluxo respiratório (PulmFI; ml/sec), à administração de bolus de adenosina (ADO) 30 nmol em ratos de 3 (A) e 24 (B) meses, em ratos anestesiados e vagotomizados, respirando espontaneamente.

As respostas à adenosina exogenamente administrada a nível da f_R , V_T e V_E foram dependentes da dose e notavelmente semelhantes em animais de 3 e 24 meses (Figura 7.3.).

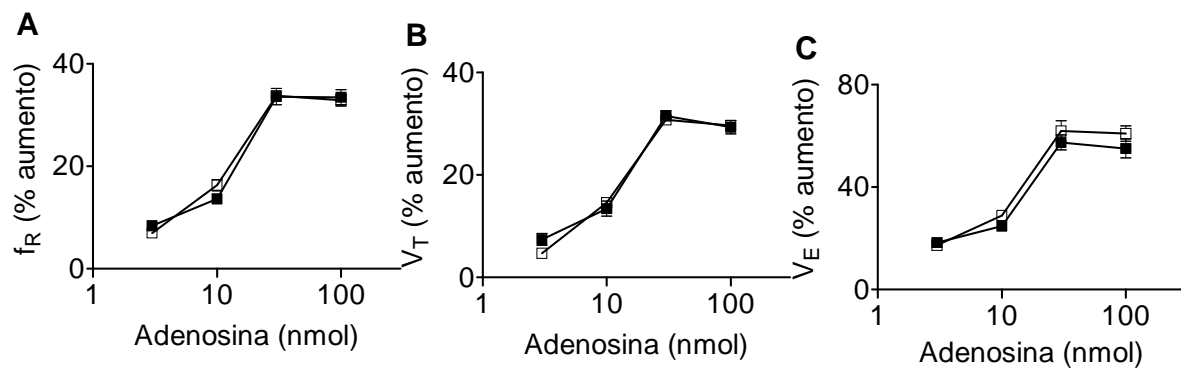


Figura 7.3. Comparação entre os efeitos da adenosina à ventilação em animais jovens e idosos

Efeitos da administração cumulativa de bolus i.c. de adenosina na frequência respiratória (f_R), volume tidal (V_T) e volume minuto respiratório (V_E), em ratos anestesiados e vagotomizados ao longo da idade. (A, B e C) curvas dose-resposta obtidas em animais: (□) 3 meses ($n=6$) e (■) 24 meses ($n=6$). 0 % de efeito corresponde para: f_R (ciclos min^{-1}), (□) $45,01 \pm 1,39$ e (■) $47,20 \pm 1,10$; V_T (mL Kg^{-1}), (□) $8,59 \pm 0,54$ e (■) $6,85 \pm 0,22$; V_E ($\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$), (□) $390,60 \pm 23,00$ e (■) $331,40 \pm 13,74$. Os dados representam média \pm S.E.M..

Os efeitos respiratórios da adenosina foram abolidos pela SNSC bilateral (Figura 7.4.).

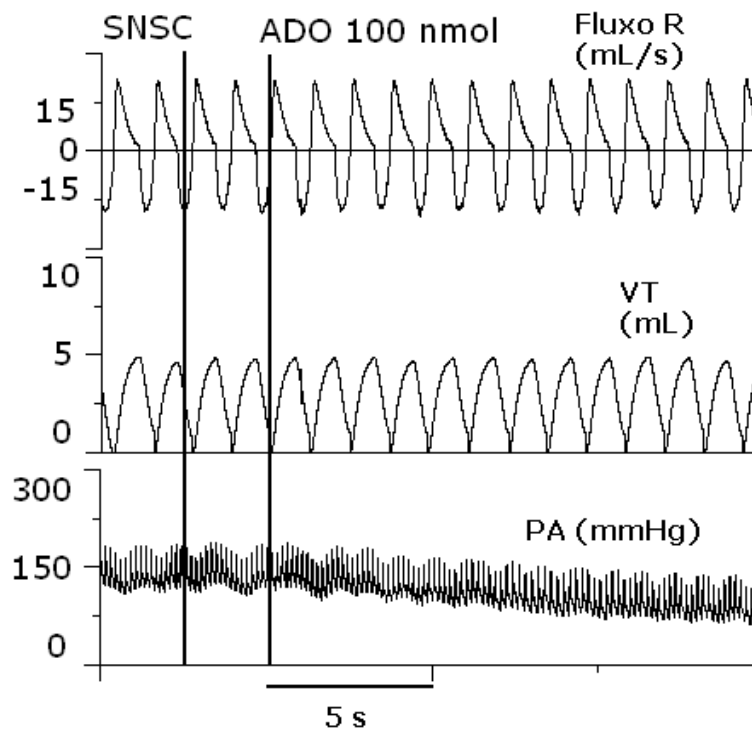


Figura 7.4. Teste da secção dos nervos do seio carotídeo

Raw data de uma experiência única num rato de 3 meses anestesiado e respirando espontaneamente, mostrando o efeito de um bolus de adenosina (ADO) 100 nmol na pressão arterial (PA em mmHg) e ventilação (fluxo respiratório em mL/s; volume corrente em mL), antes e após a secção bilateral do nervo do seio carotídeo (SNSC). O 1º traço vertical indica o momento da SNSC, e o 2º traço vertical indica o momento do bolus de adenosina. Após a SNSC, os efeitos da adenosina na ventilação são anulados, mantendo-se o efeito cardiovascular.

A adenosina exógena também induziu uma diminuição imediata da FC e PA, a qual permaneceu após a secção bilateral do NSC. Os efeitos bradicárdico e hipotensivo da adenosina 100 nmol apareceram claramente atenuados nos ratos de 24 meses (Figura 7.5.)

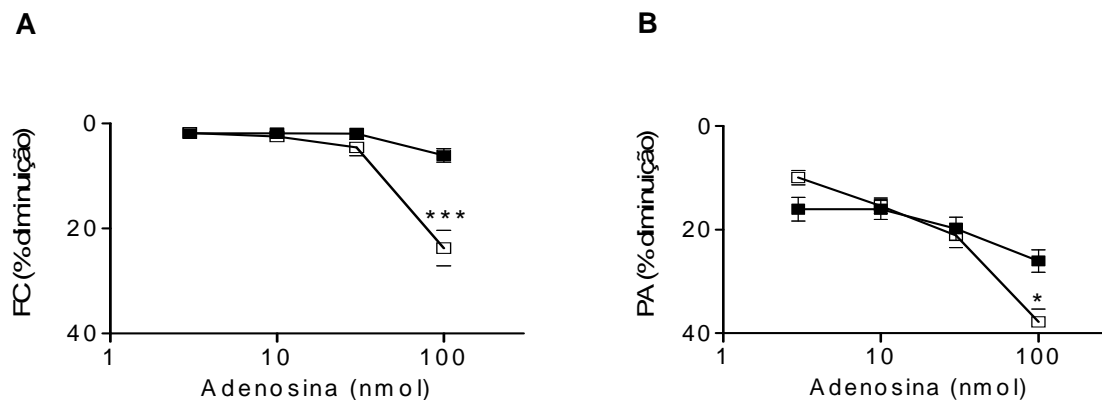


Figura 7.5. Efeito da administração de adenosina nos parâmetros cardiovasculares de ratos idosos

Efeitos da administração cumulativa de bolus I.C. de adenosina na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em ratos: (□) 3 meses (n=10) e (■) 24 meses (n=10). 0 % de efeito corresponde para : FC (batimentos min^{-1}), (□) $348,80 \pm 7,49$ e (■) $321,80 \pm 1,95$; PA (mmHg), (□) $101,90 \pm 4,95$ e (■) $81,73 \pm 4,81$. Os dados representam média \pm S.E.M., *p < 0.01; *** p < 0.0001, Mann-Whitney U-test.

7.3.2 Efeito da adenosina na ventilação na presença de um antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina (SCH 58261)

Neste grupo de experiências, a administração dos bolus de adenosina era efectuada durante a infusão I.V. de um antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina, o SCH 58261. O efeito da adenosina 100 nmol no V_E foi totalmente abolida pelo SCH 58261 ($20 \text{ ng Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), quer nos animais jovens, quer nos envelhecidos (Figura 7.6.).

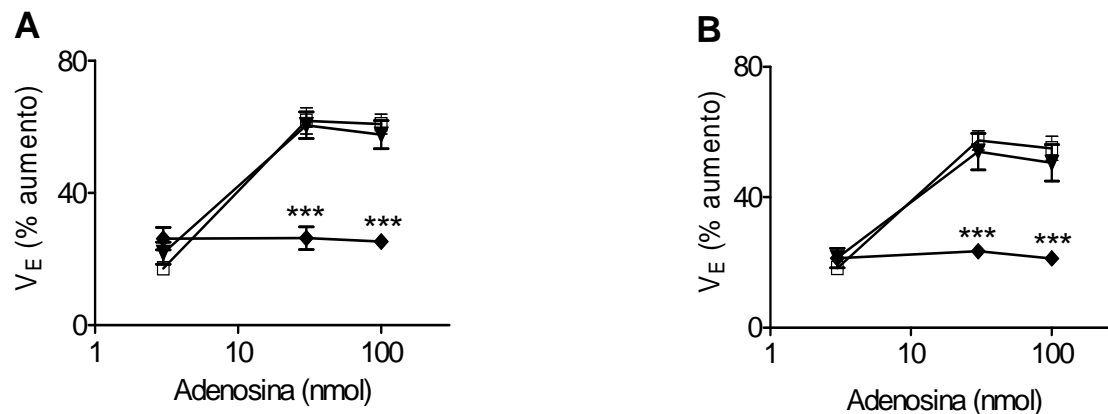


Figura 7.6. Efeito do SCH 58261 nas respostas ventilatórias à adenosina em ratos jovens e idosos

Curvas dose-resposta cumulativas para os efeitos da administração de bolus de adenosina I.C. no volume minuto respiratório (V_E) em ratos anestesiados e vagotomizados na ausência e na presença de infusões de SCH 58261, ao longo da idade. (A) ratos com 3 meses e (B) ratos com 24 meses. (□) Na ausência de SCH 58261 ($n=12$); e na presença de infusão I.V. SCH 58261 I.V. ($n=6$) (▼) $2 \text{ ng Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; (♦) $20 \text{ ng Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. 0 % de efeito no V_E ($\text{mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) corresponde aos seguintes valores: (A) $526,00 \pm 28,25$ (▼) e $427,00 \pm 15,46$ (♦); (B) $377,60 \pm 7,56$ (▼) e $305,70 \pm 33,45$ (♦). Os dados representam média \pm S.E.M., *** $p < 0.0001$, Mann-Whitney U-test.

7.3.3 Efeitos cardiovasculares da adenosina na presença de SCH 58261 ao longo da idade

A Figura 7.7. mostra que o bloqueio dos receptores A_{2A} (SCH 58261; $2\text{-}20 \text{ ng Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) não impede a diminuição da FC e PA causada pela adenosina, tanto em jovens como em animais envelhecidos. Pelo contrário, observou-se uma maior redução na FC causada pela adenosina na presença do antagonista dos receptores A_{2A} .

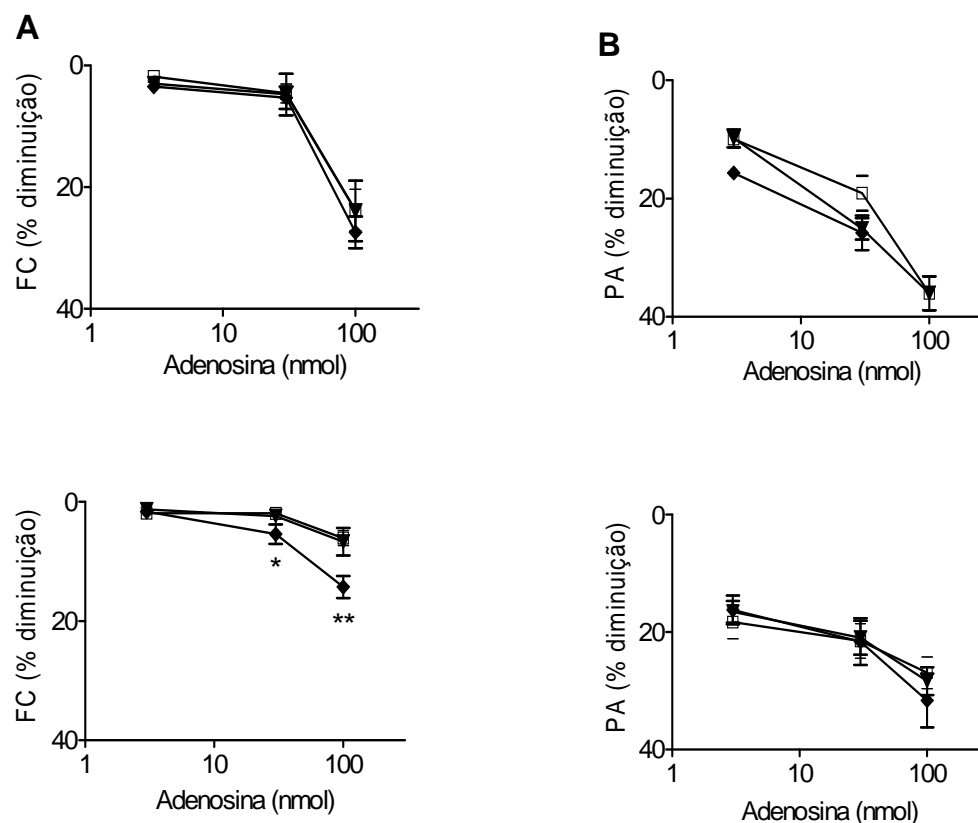


Figura 7.7. Efeito do SCH 58261 nas respostas cardiovasculares à adenosina em ratos jovens e idosos

Curvas dose-resposta cumulativas para os efeitos da administração de bolus de adenosina I.C. na frequência cardíaca (FC) e na pressão arterial (PA) na ausência e na presença de infusões de SCH 58261, em ratos com 3 meses (A); e ratos com 24 meses (B). (□) Na ausência de SCH 58261 (n=12); e na presença de infusão de SCH 58261 I.V. (n=6) (▼) 2 ng.Kg⁻¹.min⁻¹; (◆) 20 ng.Kg⁻¹.min⁻¹. 0 % de efeito no FC (batimentos min⁻¹) corresponde aos seguintes valores: (A) 352,70 ± 7,30 (▼) e 357,50 ± 6,94 (◆); (B) 313,00 ± 5,61 (▼) e 321,90 ± 11,58 (◆); e na TA (mmHg) corresponde aos seguintes valores: (A) 98,21 ± 5,79 (▼) e 102,80 ± 6,47 (◆); (B) 75,88 ± 4,20 (▼) e 84,78 ± 8,40 (◆). Os dados representam média ± S.E.M., *p < 0.01; ** p < 0.001, Mann-Whitney U-test.

7.3.4 Efeitos cardioventilatórios do SCH 58261

O SCH 58261 sozinho na dose de 2 ng Kg⁻¹ min⁻¹ I.V. aumentou o V_E (18.5 ± 0.5 e 16.4 ± 0.8 %, respectivamente em ratos de 3 e 24 meses) de modo significativo (p < 0.01), enquanto que na dose de 20 ng Kg⁻¹ min⁻¹ I.V. não causou, por si só, alterações apreciáveis do V_E tanto nos ratos de 3 como nos de 24 meses (Figura 7.8 A).

A administração do antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina SCH 58261 sozinho não tem efeito na FC e PA (Figura 7.8 B).

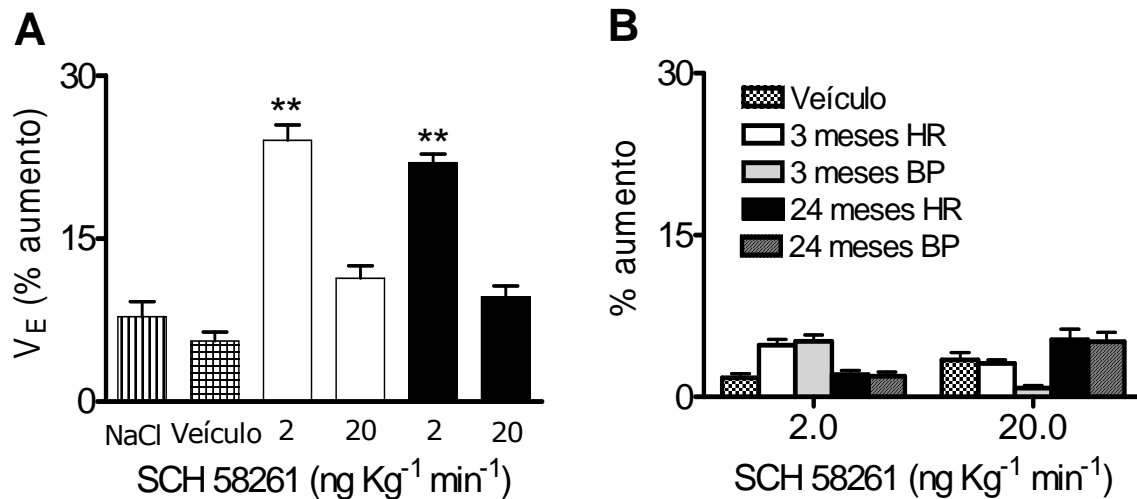


Figura 7.8. Efeito da infusão de SCH 58261 nos parâmetros cardioventilatórios de ratos jovens e idosos

Os efeitos da infusão I.V. de SCH 58261 (2 and 20 ng Kg⁻¹ min⁻¹) no (A) volume minuto respiratório (V_E), e (B) frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em ratos anestesiados e vagotomizados de 3 e 24 meses de idade (n=6). Apenas uma dose de SCH 58261 foi testada por animal. 0 % de efeito corresponde aos valores mostrados nas figuras 7.6. e 7.7.. Os dados representam média ± S.E.M., **p < 0.01, Mann-Whitney U-test comparado com veículo.

7.4 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado para testar o efeito da idade nas respostas ventilatórias à adenosina mediado pelo corpo carotídeo.

Os resultados obtidos no presente trabalho com adenosina exógena e manipulando os seus efeitos endógenos com a utilização de um antagonista da adenosina, mostraram que os receptores de adenosina não estão deteriorados de modo significativo nos animais envelhecidos.

A adenosina foi escolhida para ser testada neste presente modelo porque é um mediador bem conhecido do corpo carotídeo, e tem indicações terapêuticas específicas na prática clínica.

A adenosina é útil para tratar a taquicardia supraventricular, um distúrbio do ritmo frequentemente observado no idoso (Riccardi *et al.*, 2008; Medi *et al.*, 2009). Contudo, não existem estudos acerca deste efeito nos indivíduos idosos.

Apesar do presente trabalho não ter estado focado nos efeitos cronotrópicos, dromotrópicos e batmotrópicos da adenosina, foi observado um menor efeito bradicardizante nos animais envelhecidos, sugerindo que a eficácia da adenosina para reverter a taquicardia supraventricular está atenuada no idoso.

No presente trabalho, o efeito inibitório da adenosina na FC e PA (Monteiro & Ribeiro, 1987; Monteiro & Ribeiro, 1991) não é da mesma magnitude nos ratos velhos e nos seus controlos de 3 meses. Este novo dado poderia ser explicado por uma diminuição com a idade do número de receptores A_1 de adenosina a nível cardíaco, tal como tem sido descrito noutros tecidos. De facto, a nível do músculo cardíaco de rato alguns autores observam uma redução da expressão dos receptores A_1 e A_{2A} de adenosina com o envelhecimento (Jenner *et al.*, 2004), havendo também uma diminuição das respostas mediadas pelos receptores A_1 de adenosina, ou seja um declínio dependente da idade da transdução inibitória de sinal, provavelmente a nível da interacção adenosina/receptor e/ou ligação proteica receptor/guanina (Gao *et al.*, 1997).

Em relação às alterações cardiovasculares induzidas pela administração intracarotídeas de adenosina (diminuição na FC e PA), o SCH 58261 nas doses por nós utilizadas não produziu antagonismo.

A administração do SCH 58261 sozinho não tem efeito na FC e PA (Figura 7.8.).

A activação dos receptores A_{2A} e A_{2B} de adenosina da medula rostral ventrolateral, conduz a uma redução da PA (Scislo *et al.*, 2001; Harden *et al.*, 2002; Nassar & bdel-Rahman, 2006).

O [H3] SCH58261 (7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazole-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c] pyrimidine) administrado sistemicamente *in vivo* marca directamente os receptor A_{2A} de adenosina do estriado, o que demonstra a capacidade deste antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina em passar a BHE (El Yacoubi et al., 2000), e até à dose de 1 mg/Kg, I.P. não modifica nenhum dos parâmetros hemodinâmicos dos ratos (Monopoli *et al.*, 1998; El Yacoubi et al., 2000).

Foi previamente descrito que, em ratos anestesiados e vagotomizados, os receptores A_{2A} de adenosina são os mediadores do aumento do V_E causado pela adenosina (Monteiro & Ribeiro, 1991). Mais tarde foi concluído que a adenosina endógena exerce os seus efeitos excitatórios através da acção conjunta dos receptores A_{2B} pré-sinápticos e A_{2A} pós-sinápticos (Conde *et al.*, 2006c).

O SCH 58261 preveniu os efeitos na respiração da adenosina exogenamente administrada. Este facto corrobora que estes efeitos da adenosina são mediados por receptores A_{2A} de adenosina. Estas conclusões apoiam a evidência apresentada aqui e noutros trabalhos (Belardinelli *et al.*, 1996; Dionisotti *et al.*, 1996) de que o SCH 58261 é um antagonista competitivo e selectivo dos receptores A_{2A} de adenosina (Quadro 7.1) quando usado em concentrações menores ou iguais a 20 nM (Zocchi *et al.*, 1996ab; Zocchi *et al.*, 1996ba). Em estudos funcionais, a potência do SCH 58261 encontra-se no nível nM (Zocchi *et al.*, 1996ab).

Quadro 7.1. Afinidade (pK_i) dos antagonistas SCH 58261 e ZM-241385 para os receptores A_{2A} e A_{2B} .

Antagonista	Afinidade (pK_i)		
	A_1	A_{2A}	A_{2B}
SCH 58261	6,3	9,0 - 9,2	6,5
ZM-241385	6,6	9,1	6,8 – 8,2

O SCH 58261 é preferido ao ZM 241385 para o bloqueio dos receptores A_{2A} de adenosina, pela sua maior selectividade relativamente aos A_{2B} (Quadro 7.1). (Ongini *et al.*, 1999; Beukers *et al.*, 2000). Como não há referência na bibliografia ao uso do SCH 58261 em infusão, nós adoptámos o critério que a dose I.V. é equivalente a 1/10 a 1/20 da dose I.P. (Carta *et al.*, 2003; Catelli *et al.*, 2003).

Nas doses de $0.001 \text{ nmol.min}^{-1}$, a infusão do SCH 58261 causou um efeito excitatório na ventilação. Este efeito parece ser mediado pelo bloqueio central dos receptores A_{2A} de adenosina, assumindo que estes receptores deprimem a respiração (Koos & Chau, 1998; Koos *et al.*, 2002), e o referido efeito excitatório na ventilação persiste em ratos com deservação dos corpos carotídeos (Koos & Chau, 1998; Koos *et al.*, 2002). Na dose de $0.01 \text{ nmol.min}^{-1}$, a infusão de SCH 58261 não causou qualquer efeito na ventilação, dado que nesta dose o SCH 58261 também inibe os receptores A_{2A} de adenosina periféricos (Koos & Chau, 1998; Koos *et al.*, 2002). A inactivação dos receptores A_{2A} de adenosina diminui a actividade ventilatória e, em última análise, reduz a ventilação em repouso (Montandon *et al.*, 2007). Não foi observada diferença entre os ratos de 3 e 24 meses.

O nosso veículo (DMSO 0.4 mM ou 0.01%) estimula o V_E (De la Torre & Rowed, 1974) e diminui a temperatura corporal (Orlando & Panuska, 1972). Contudo, como foi demonstrado (Figura 7.8 A), o V_E manteve-se constante, pelo menos durante o período experimental testado, e portanto acreditamos que o DMSO não afectou os nossos resultados, o que atribuímos à baixa concentração de DMSO utilizada. Quanto à temperatura, ela manteve-se constante graças ao cobertor térmico utilizado.

Em conclusão, o efeito excitatório da adenosina exógena mediado pelos receptores A_{2A} de adenosina a nível do corpo carotídeo não se modificou com a idade. No entanto, o efeito bradicárdico da adenosina exógena mediado pelos receptores A_1 de adenosina encontra-se atenuado nos animais envelhecidos. Este facto reduz o interesse clínico da adenosina para reverter a taquicardia supraventricular no idoso.

VIII CAPÍTULO

EFEITO DA IDADE NA CONCENTRAÇÃO DE CAMP NO CORPO CAROTÍDEO EM RESPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÉNIO

8 EFEITO DA IDADE NA CONCENTRAÇÃO DE cAMP NO CORPO CAROTÍDEO EM RESPOSTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÉNIO

8.1 INTRODUÇÃO

Nos capítulos precedentes demonstrou-se, usando um modelo *in vivo* em ratos anestesiados, que a resposta por parte do corpo carotídeo a estímulos como a isquemia ou a administração de fármacos não se altera ao longo da idade.

Neste capítulo foi investigada numa preparação *in vitro* de corpo carotídeo inteiro, em ratos envelhecidos, a resposta à hipoxia do conteúdo de cAMP do corpo carotídeo como um indicador celular da função do corpo carotídeo. Tem sido postulado que o cAMP esteja envolvido na resposta do corpo carotídeo à hipoxia. Diversos estudos sugerem que o cAMP desempenha um papel modulador no mecanismo sensor de O₂ (Delpiano & Acker, 1984; Gonzalez *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997). O cAMP é o segundo mensageiro comum aos receptores metabotrópicos ligados à adenilatociclase. No corpo carotídeo, os níveis de cAMP são regulados pelos efeitos estimulantes da adenosina mediados pelos receptores A_{2A} e A_{2B} (Monteiro *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Conde *et al.*, 2006a), pela actividade dos receptores adrenérgicos β (Mir *et al.*, 1983) e pelos receptores D₂ e D₁ de dopamina (Mir *et al.*, 1983; Bатуca *et al.*, 2003).

Os primeiros estudos que determinam a possível presença de um sistema adenilato-ciclase / cAMP no CB foram realizados por Fitzgerald e colaboradores em 1977 (Fitzgerald *et al.*, 1977). Desde então têm vindo a ser realizados estudos para interpretar a importância deste sistema no mecanismo de quimiorrecepção do CB.

Nas células quimiorreceptoras do CB, o cAMP não parece desempenhar um papel crucial no início do processo de transdução, porque a diminuição da PaO₂ inibe canais de K⁺ em membranas isoladas (Lopez-Barneo *et al.*, 1988). Contudo, o cAMP inibe a mesma corrente de K⁺ que é inibida pela diminuição da PaO₂, explicando a potenciação da libertação deste nucleótido induzida pela hipoxia (Wang *et al.*, 1989).

Assume-se que a diminuição da PaO₂ e o estímulo ácido aumentam os níveis de cAMP no CB, e que o nucleótido potencia a libertação de neurotransmissores desencadeada pelos dois tipos de estímulos (Delpiano & Acker, 1984; Wang *et al.*, 1989; Perez-Garcia *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997). Contudo, esta evidência é

discutível porque as experiências que conduziram a estes resultados foram realizadas comparando a hipoxia com a hiperoxia, e não com a normoxia.

Na outra extremidade da cascata de transdução está a neurotransmissão entre as células quimiorreceptoras e as terminações nervosas sensitivas. Devido ao facto de em muitas estruturas a síntese e libertação de neurotransmissores ser modulada pelo cAMP, é possível que nos quimiorreceptores do CB este nucleótido cíclico também possa modular o processo (Perez-Garcia *et al.*, 1991).

Os efeitos da idade na produção de cAMP pelo corpo carotídeo nunca foram estudados. Uma razão adicional para testar esta hipótese, é que têm sido documentadas alterações relacionadas com o envelhecimento no sistema adenilato-ciclase/cAMP doutras estruturas. Por exemplo, redução da actividade da subunidade catalítica da adenilato-ciclase observada em ratos (Kilts *et al.*, 2002), e no coração de humanos com mais de 60 anos (Brodde *et al.*, 1995). Contudo, e pelo contrário, foi descrito que a capacidade máxima da forskolina para aumentar o cAMP da medula supra-renal e fígado aumenta nos ratos de 24 meses (Tumer *et al.*, 1996).

Objectivos

O objectivo das experiências descritas neste capítulo foi estudar a variação de cAMP em resposta a diferentes concentrações de O₂, bem como testar a hipótese de que a produção de cAMP, quer basal, quer em resposta a diferentes níveis de hipoxia pelo corpo carotídeo, não se altera com a idade, assumindo que os receptores de A₂ e D₂ não se alteram. Esta investigação foi levada a cabo *in vitro*, em ratos anestesiados de 3 e 24 meses, medindo o cAMP por imunoensaio enzimático.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Animais e preparação cirúrgica

Os resultados descritos no presente trabalho correspondem às experiências realizadas em 170 corpos carotídeos removidos de ratos Wistar com 3 meses de idade fêmeas e machos, tendo as fêmeas um peso médio de $294,19 \pm 6,22$ g (n=46) e os machos de $440,57 \pm 14,22$ g (n=64); e com 12, 18 e 24 meses de idade machos, com um peso médio de respectivamente $850,22 \pm 4,57$ g (n=20), $800,16 \pm 5,32$ g (n=20) e $780,22 \pm 4,42$ g (n=20).

A remoção dos corpos carotídeos foi efectuada in vivo, e imediatamente colocados em meio de incubação (vd 8.2.2. abaixo).

8.2.2 Incubação dos corpos carotídeos para estudo do efeito da variação da % de O₂ no conteúdo de cAMP

Após terem sido removidos, os corpos carotídeos (CBs) foram incubados em 1 mL de meio de incubação (MI) (*Krebs* modificado) descrito por Pérez-García e colaboradores (Perez-Garcia *et al.*, 1990) e composto por (mM): NaCl 116; NaHCO₃ 24; KCl 5; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1,1; HEPES 10; glucose 5,5. O pH do MI foi acertado até 7,40 com NaOH 1N. A incubação foi feita a 37° C num banho com agitação (*HAAKE SWB 22 ou SBS BT - 21*) durante 15 minutos, e o MI foi equilibrado em hiperóxia. O objectivo deste período de pré - incubação foi o de permitir a recuperação dos corpos carotídeos da eventual isquémia resultante do processo cirúrgico.

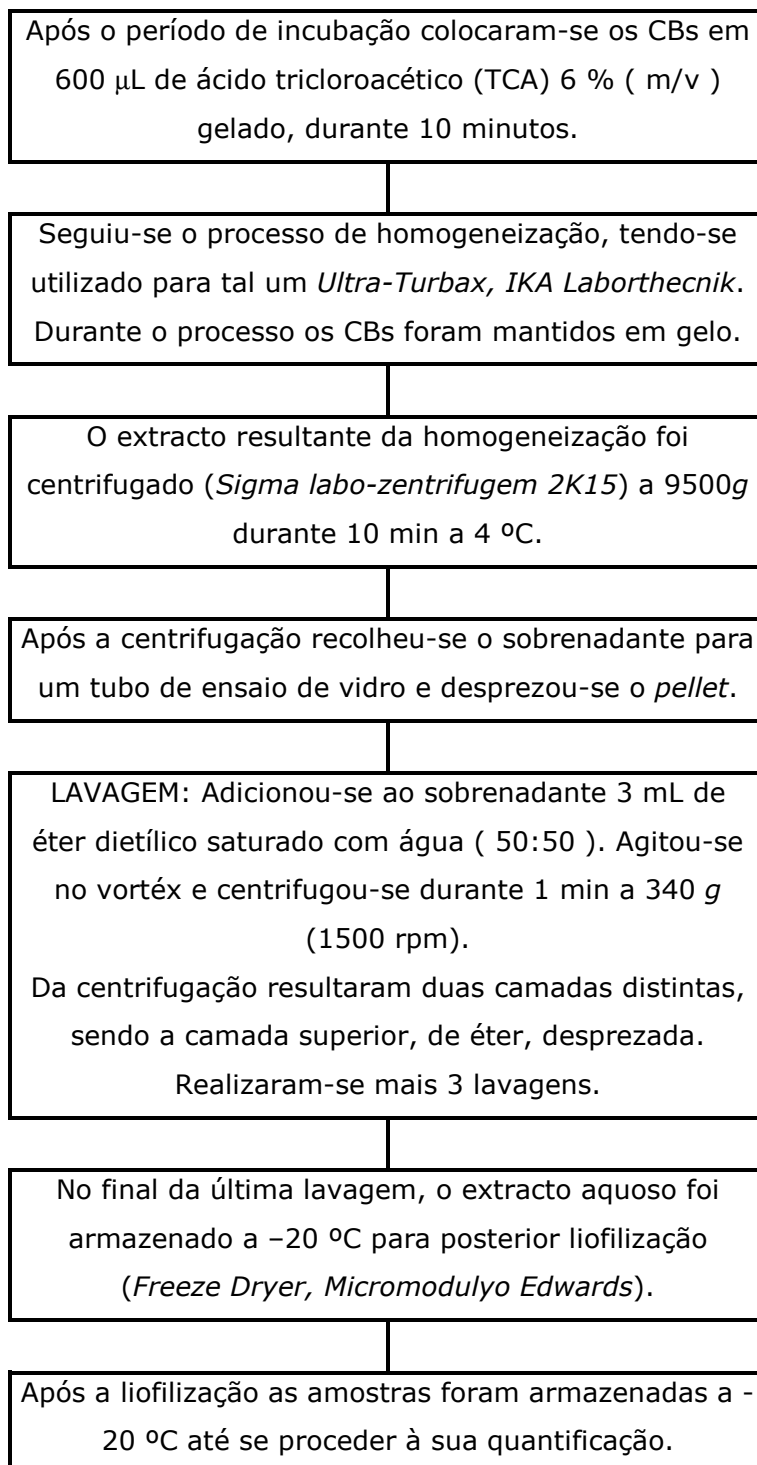
A solução de pré - incubação continha, para além de MI, IBMX 0,5 mM, um inibidor das fosfodiesterases. Seguiu-se um período de incubação de 30 min, numa solução que continha MI e IBMX 0,5 mM a 37 °C num meio equilibrado com as diferentes % O₂ estudadas:

- A. 95 %O₂ / 5 %CO₂ (hiperóxia);
- B. 20 %O₂ / 5 %CO₂ / 75 %N₂ (normóxia),
- C. 10 %O₂ / 5 %CO₂ / 85 %N₂ (hipoxia 10 %O₂)
- D. 5 %O₂ / 5 %CO₂ / 90 %N₂ (hipoxia 5 %O₂).

Este período de incubação foi escolhido, dado que no nosso laboratório foi provado previamente que as concentrações de cAMP obtidas durante incubações de 30 min são significativamente mais elevadas do que as obtidas durante 10 min (Batuca *et al.*, 2003), e mantêm valores nomais de viabilidade celular (Conde & Monteiro, 2004).

8.2.3 Extracção do cAMP das amostras

Neste trabalho experimental o método de extracção do cAMP utilizado foi o seguinte:



8.2.4 Quantificação de cAMP por EIA

Os EIAs, por vezes chamados *enzyme – linked immunosorbant assay* ou ELISA, foram desenvolvidos durante os anos 60 a partir dos imunoensaios radioactivos (RIAs), e combinam a especificidade de uma reacção imunológica, cujo princípio

básico é a especificidade de um Ag combinada com a especificidade de um Ac, que dá origem a um complexo antigénio – anticorpo (Ag - Ac), com a sensibilidade de um ensaio enzimático espectrofotométrico simples, pelo uso de Ac ou Ag conjugados a um enzima. Esta enzima conjugado com o Ac ou o Ag reage com um substrato incolor (cromogénico), e da reacção resulta um produto corado que pode ser detectado visualmente (para análise qualitativa) ou por espectrofotometria (para análise quantitativa).

O tipo de EIA utilizada no presente trabalho para quantificar os níveis de cAMP produzidos pelo CB em diferentes condições experimentais foi o método competitivo, que se encontra esquematizado na Figura 8.1. Neste método, o cAMP presente nos padrões ou nas amostras desconhecidas competem com uma quantidade fixa de cAMP marcado com peroxidase de rábano (cAMP*) para um número limitado de locais de ligação a um Ac primário específico para o cAMP (antisoro de coelho anti - cAMP).

O suporte utilizado é uma placa de microtitulação com 96 poços revestidos com um Ac secundário, o Ig de burro anti-coelho. Uma quantidade fixa de Ac primário específico, o antisoro de coelho anti - cAMP, é imobilizada no Ac secundário que reveste a placa permitindo que o cAMP não marcado e o cAMP* compitam para os seus locais de ligação. A quantidade de Ac primário e a de cAMP* que se liga ao Ac primário são fixas, e esta última é inversamente proporcional à concentração adicionada de cAMP não marcado dos padrões ou das amostras existente nos poços. Após um período de incubação, o cAMP não ligado (cAMP marcado e não marcado) é removido por lavagens dos poços (4 vezes). O 3',3',5',5' - Tetrametilbenzidina (TMB), que é o substrato da enzima, é adicionado, desencadeando a reacção colorimétrica em proporção à quantidade de cAMP* ligada ao Ac primário em cada poço. Uma vez que a quantidade de cAMP* é inversamente proporcional à quantidade de cAMP não marcado presente nos padrões e nas amostras, os valores mais elevados de absorvência correspondem a baixas concentrações de cAMP nos padrões ou nas amostras. A concentração de cAMP das amostras desconhecidas é determinada pela interpolação dos valores obtidos, na curva padrão construída a partir de padrões de concentração conhecida.

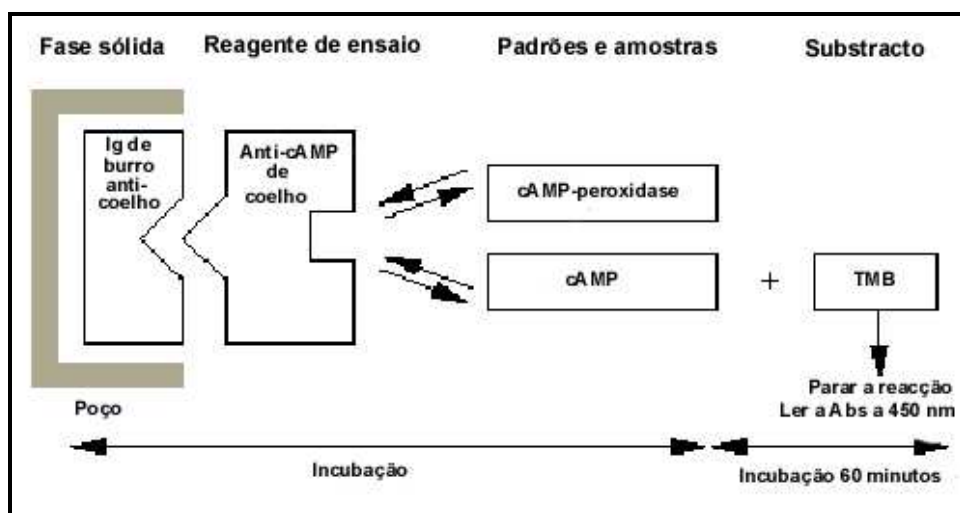


Figura 8.1 Princípio do imunoenensaio enzimático utilizado no presente trabalho experimental.

Na aplicação desta metodologia utilizam-se reagentes específicos para EIA (RPN 225 Amersham), tendo sido necessário o seguinte equipamento:

- ❖ para a incubação da placa, um agitador de placas (*IKA-Schuttler HTS 2*);
- ❖ para as lavagens dos poços, um aparelho de lavagem e aspiração (*MultiWash II Tricontinet*);
- ❖ para a leitura de absorvências um leitor de absorvências de microplacas (*Rosys Anthos 2010*).

8.2.4.1 Notas de procedimento:

- ❖ Deixaram-se as amostras e todos os reagentes atingir a temperatura ambiente antes de iniciar a experiência;
- ❖ Misturaram-se as amostras e todos os reagentes antes de iniciar o preenchimento da placa;
- ❖ Evitou-se a formação de espuma aquando da agitação dos reagentes;
- ❖ Manteve-se a placa tapada, excepto quando se estava a adicionar reagentes aos poços ou a fazer leituras;
- ❖ Padrões e amostras foram ensaiados em duplicado;
- ❖ Fez-se uma curva padrão para cada placa ensaiada.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Efeitos da idade nos níveis de cAMP no corpo carotídeo em resposta a diferentes concentrações de oxigénio

Os níveis de cAMP em corpos carotídeos isolados de ratos com 3, 12, 18 e 24 meses incubados em soluções normóxicas (20% O₂) são mostrados na Figura 8.2. Não foram encontradas diferenças entre os níveis de cAMP (expressos por corpo carotídeo ou corrigidos por peso do corpo carotídeo) dos corpos carotídeos de ratos jovens e velhos. Os pesos dos corpos carotídeos (μg) alteravam-se ligeiramente através da idade e eram: 49±7 (3 meses), 46±8 (12 meses), 75±12 (18 meses) e 70±10 (24 meses).

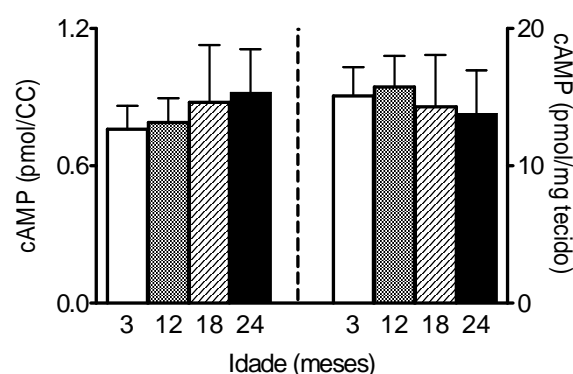


Figura 8.2. Efeito da idade nos níveis de cAMP

Efeito da idade nos níveis de cAMP (expressos em pmol/CC e em pmol/mg de tecido) nos corpos carotídeos de ratos (n=12-16) incubados em condições de normóxia (20% O₂). Os dados representam média ± S.E.M..

A Figura 8.3. mostra o efeito da idade na produção de cAMP induzida por diferentes concentrações de O₂ aplicadas aos corpos carotídeos. Após a incubação com soluções equilibradas com 95% O₂/5% CO₂ (PO₂ de aproximadamente 677 mmHg) quantificaram-se níveis de cAMP mais baixos, mas não estatisticamente significativos, do que quando os corpos carotídeos eram incubados com PO₂ com valores perto dos fisiológicos, ou seja normóxia (≈142 mmHg; soluções de incubação equilibradas com 20% O₂/5%CO₂). No corpo carotídeo, o nível de cAMP em condições de normóxia é mantido a uma PO₂ baixa de 71 mmHg (10% O₂) e 35 mmHg (5% O₂). Este padrão e a quantidade de cAMP produzido pelos corpos carotídeos não se alteraram com a idade.

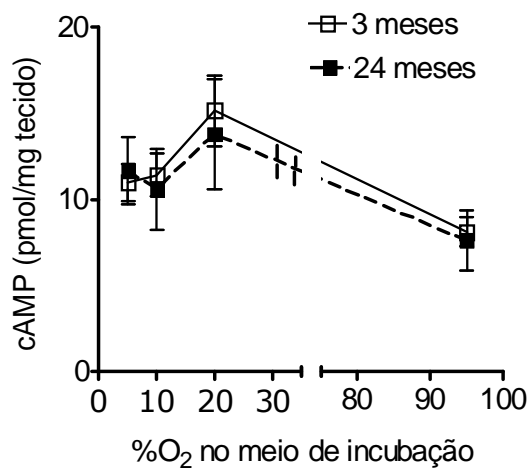


Figura 8.3. Efeito da idade nos níveis de cAMP no corpo carotídeo em resposta a diferentes concentrações de oxigênio

Comparação entre os níveis de cAMP nos corpos carotídeos de ratos com 3 (n=14-18) e 24 (n=10-12) meses incubados com diferentes concentrações de O₂. Os dados representam média ± S.E.M..

8.4 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado para testar o efeito directo de diferentes níveis de O₂ na produção de cAMP ao longo da idade numa preparação *in vitro* de corpo carotídeo de rato.

O nível de cAMP em normóxia (20 % PO₂≈142 mmHg) nos ratos de 3 meses foi 0.76 ± 0.10 pmol/corpo carotídeo ou 15.12 ± 2.06 pmol mg⁻¹ de tecido, não sendo este nível estatisticamente diferente daquele encontrado no corpo carotídeo dos animais velhos. Expresso por unidade de peso, os níveis de cAMP encontrados neste estudo para o corpo carotídeo de rato são idênticos aos descritos no corpo carotídeo de coelho (Perez-Garcia *et al.*, 1990; Cachero *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Em todas as idades, o nível de cAMP era máximo em condições de normoxia. Comparando com a normoxia, a hiperoxia causou uma diminuição no cAMP do corpo carotídeo de todas as idades. Os níveis de cAMP do corpo carotídeo em hiperoxia diferenciam-se dos de hipoxia quer no rato jovem, quer no envelhecido, permanecendo constante ao longo da idade o padrão de produção de cAMP em resposta a diferentes PO₂. Os resultados presentes não coincidem com os da literatura já mencionada, na qual é observado um aumento do cAMP com a hipoxia (Delpiano & Acker, 1984; Wang *et al.*, 1989; Perez-Garcia *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997), mas são suportados por um trabalho posterior, em que a IBMX e outros inibidores das fosfodiesterases como o rolipram e o Ro 20-1724 aumentam o conteúdo de cAMP no corpo carotídeo de modo concentração-dependente em condições de normoxia, e a hipoxia desvia as suas curvas concentração-resposta para a esquerda (Nunes *et al.*, 2010).

Frequentemente, os estudos que quantificam o cAMP no corpo carotídeo em condições de normoxia ou hipoxia aguda usaram a IBMX (500 µM), um inibidor não selectivo das fosfodiesterases (Mir *et al.*, 1984; Perez-Garcia *et al.*, 1990; Batuca *et al.*, 2003). Contudo, a interpretação dos efeitos da IBMX pode ser confundida por alterações da actividade das fosfodiesterases causadas pela própria hipoxia. Por exemplo, a hipoxia aguda (20 min) aumenta a actividade da fosfodiesterase dependente de Ca²⁺ no corpo carotídeo (Hanbauer & Lovenberg, 1977).

A diferença de espécies – coelho, nas experiências de Perez-Garcia (Perez-Garcia *et al.*, 1990) – no balanço global adenilatociclase/fosfodiesterase pode contribuir para esta diferença nos valores de cAMP obtidos em resposta a alterações nas

concentrações de O_2 . Para além das espécies, outras diferenças nos procedimentos experimentais foram encontradas entre o trabalho de Pérez-Garcia *et al.* (1990) e o presente trabalho. No primeiro, os corpos carotídeos foram removidos das bifurcações das carótidas *in vitro*, permitida a sua recuperação em condições de hiperoxia, e o efeito da hipoxia era calculado da comparação entre as concentrações de cAMP obtidas durante incubações em 100% e 5% de O_2 . Este facto pode contribuir também para as diferenças na acumulação de cAMP, dado que foram encontradas evidências de que o meio de pré-incubação usado para permitir a recuperação das preparações dos procedimentos cirúrgicos não causa alterações significativas nas respostas à futura incubação (Nunes *et al.*, 2010).

Estar-se-ia à espera que os efeitos da adenosina via receptores A_{2A} , os quais é sabido estarem expressos no corpo carotídeo (Gauda, 2002), poderiam ser um mecanismo que levaria a níveis aumentados de cAMP durante a hipoxia. Mas é de salientar que a libertação de adenosina no corpo carotídeo é máxima em níveis moderados de hipoxia (10% O_2), diminuindo com estimulações hipóxicas de intensidade mais elevada, e que a hipoxia mais marcada utilizada neste estudo não aumenta a libertação de adenosina no SCG ou CA (Conde & Monteiro, 2004). Claro que a adenosina não é o único modelador dos níveis de cAMP do corpo carotídeo, dado que tal como é sabido a hipoxia também aumenta a libertação de outros neurotransmissores, particularmente de dopamina (Vicario *et al.*, 2000). Também é sabido que o corpo carotídeo expressa níveis elevados de receptores D_2 de dopamina (Gauda, 2002), os quais estão negativamente ligados à adenilato ciclase (Kebabian & Calne, 1979). O facto de o nível de libertação de dopamina ser muito mais elevado no rato do que no coelho em condições de hipoxia (Vicario *et al.*, 2000) pode explicar a incapacidade da hipoxia para aumentar os níveis de cAMP no corpo carotídeo de rato acima daqueles encontrados em normoxia, tal como já tinha sido previamente observado no coelho (Cachero *et al.*, 1996). Deve ser mencionado que Mir e seus colaboradores no seu estudo pioneiro também constataram que O_2 a 5% administrado *in vivo* não modificou de modo significativo os níveis de cAMP no corpo carotídeo de rato (Mir *et al.*, 1983).

Outro aspecto a considerar na nossa discussão relaciona-se com a manutenção nos níveis de cAMP em resposta à hipoxia ao longo da idade. A ausência de alterações significativas na produção de cAMP nos animais velhos não é

incompatível com alterações individuais na actividade da adenilatociclase e/ou dos receptores metabotrópicos, mas significa que, se ocorrerem alterações individuais, o resultado final não se altera.

Os efeitos da idade na acumulação de cAMP noutras preparações revelam deterioração na actividade da subunidade catalítica da adenilatociclase em coração de ratos (Kilts *et al.*, 2002), e no coração de humanos com idade superior a 60 anos (Brodde *et al.*, 1995). Contudo, pelo contrário, tem sido descrito que a capacidade máxima da forskolina para aumentar o cAMP na supra-renal e fígado está aumentada em ratos de 24 meses (Tumer *et al.*, 1996).

Em conclusão, as condições óptimas para a produção de cAMP nos corpos carotídeos encontram-se na situação de normoxia. Salienta-se que os corpos carotídeos revelam níveis mais elevados de cAMP em hipoxia do que em hiperoxia. O facto de não ser durante a hipoxia que surgem os níveis mais elevados de cAMP, não é consistente com um papel específico do cAMP nos mecanismos sensores de O_2 a nível dos corpos carotídeos. Aparentemente, a idade não alterou nem a produção basal de cAMP, nem a produção de cAMP em resposta a diferentes concentrações de O_2 .

9 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

9.1 RESUMO DOS RESULTADOS

Este trabalho teve por objectivo testar a hipótese de que o corpo carotídeo se mantém viável ao longo da idade, tendo sido realizada uma abordagem funcional da actividade quimiorreceptora deste órgão, que incluiu as respostas ventilatórias à isquemia e à manipulação farmacológica de dois mediadores muito importantes do corpo carotídeo, bem como estudos com hipoxia. Foi usado um modelo *in vivo* de rato anestesiado e respirando espontaneamente, onde medimos as consequências ventilatórias à isquemia e a fármacos; e um modelo *in vitro* de corpo carotídeo de rato para medir a acumulação de cAMP intracelular consequente à variação de O₂.

O uso de modelos animais *in vivo* é crucial para o presente e futuro da investigação biomédica porque:

- Os modelos animais proporcionam um conhecimento do organismo como um todo, o qual não se consegue reproduzir doutra forma no actual contexto da ciência;
- Os modelos animais são o culminar das linhas que ligam os organismos aos seus processos fisiológicos;
- O uso de modelos animais na investigação, quer básica, quer clínica, é um precursor apropriado de uma investigação segura e ética em seres humanos.

A ciência depende das pesquisas que possam avaliar e redefinir continuamente a melhor utilização de modelos animais na investigação, incluindo o desenvolvimento de modelos animais alternativos.

O uso do modelo *in vitro* prende-se com as alternativas ao uso dos animais *in vivo* e a prática dos 3 Rs: Substituição (*replacement*), redução e refinamento. A implementação dos 3 Rs é amplamente aceite como caminho pragmático de endereçar questões éticas e de bem-estar dos animais de laboratório.

A isquemia, induzida no rato anestesiado pela oclusão bilateral da carótida comum, aumentou a ventilação espontânea, e esta resposta manteve-se semelhante ao longo da idade.

Os estudos realizados com a administração de bolus de dopamina ou de adenosina, sob infusão de soro fisiológico ou de um antagonista, não mostraram qualquer alteração das respostas ventilatórias nos ratos velhos em comparação com os seus controlos jovens. A dopamina e a adenosina foram escolhidas para serem testadas neste modelo porque ambas são mediadores bem conhecidos do

corpo carotídeo, e possuem indicações terapêuticas específicas na prática clínica. Para além disso, desde há muito que estudos apontam para uma interacção dopamina – adenosina no corpo carotídeo. Por exemplo, Ribeiro e McQueen descobriram que a adenosina potencia o efeito da dopamina na actividade do NSC do gato (McQueen & Ribeiro, 1983). Do mesmo modo, Monteiro e Ribeiro observaram que o efeito inibitório dos agonistas dos receptores D_2 de dopamina na ventilação é atenuado ou até revertido pelo bloqueio dos receptores A_2 de adenosina (Monteiro & Ribeiro, 2000). De facto, a adenosina controla a libertação de catecolaminas do corpo carotídeo actuando em receptores A_{2B} , havendo evidência de que existe um antagonismo entre os receptores A_{2B} de adenosina e D_2 de dopamina no corpo carotídeo (Conde *et al.*, 2008), o que explicaria as interacções dopamina – adenosina na ventilação observadas previamente. De facto, os receptores A_{2B} e D_2 interagem para modular a libertação de catecolaminas do corpo carotídeo de rato entre os passos da entrada de Ca^{2+} e o aumento do Ca^{2+} livre intracelular, e a activação da exocitose e libertação de neurotransmissores (Conde *et al.*, 2009). Adicionalmente, os receptores A_2 e D_2 estão ambos acoplados a proteínas G ligadas à adenilato-ciclase de modos opostos: enquanto que os receptores A_2 estão acoplados a proteínas G_s , e da sua activação resulta um aumento dos níveis de cAMP (Fredholm, 2007), os receptores D_2 estão acoplados a proteínas inibitórias G_i/G_o , e da sua activação resulta uma diminuição dos níveis de cAMP (Zeng *et al.*, 2007). Portanto, ambos os neurotransmissores podem ser analisados ao nível do segundo mensageiro e da sua cascata de sinalização. *In vitro*, a quantificação da acumulação de cAMP em resposta às várias concentrações de O_2 consubstancia as observações prévias, já que não foi manifestada alteração nesta resposta ao longo da idade.

Esta tese contribuiu indirectamente para o conhecimento do efeito da idade nos mecanismos de sensibilidade ao oxigénio, focando-se no controlo periférico da ventilação mediado pelo corpo carotídeo.

A identificação das modificações funcionais inerentes ao processo normal de envelhecimento é muito importante no sentido de poderem ser detectadas e feita a sua profilaxia, e deste modo contribuir para a elaboração de protocolos de intervenção.

As principais descobertas desta tese podem ser sumarizadas como se segue:

- Aparentemente, o controlo periférico da ventilação não se deteriora com a idade;

- Mantendo-se o corpo carotídeo viável ao longo da idade, e sendo uma das estratégias na terapêutica da doença de Parkinson a substituição dos neurónios perdidos na *substancia nigra* por células dopaminérgicas saudáveis, esta tese apoia o corpo carotídeo no papel de um forte candidato como fonte autóloga de células;
- No corpo carotídeo envelhecido, o tonus inibitório endógeno da dopamina está ligeiramente reduzido, mas a diminuição da ventilação causada pela dopamina exógena está preservada, o que deve ser tomado em consideração quando a dopamina é usada como ferramenta terapêutica na disfunção cardiovascular associada ao choque;
- O efeito excitatório da adenosina exógena mediada pelos receptores A_{2A} a nível dos quimiorreceptores do corpo carotídeo não é modificado pela idade;
- O efeito bradicárdico da adenosina exógena (mediada pelos receptores A_1) está atenuado nos animais envelhecidos;
- O padrão de produção de cAMP em resposta a diferentes concentrações de O_2 mantém-se praticamente inalterado nos animais envelhecidos.

9.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de nos fornecerem boas indicações, as diferenças fisiológicas entre os animais de laboratório e os seres humanos fazem com que muitas vezes os seus organismos respondam de modo completamente diferente, de forma a que esses estudos possam não ser conclusivos. Afinal, os efeitos de uma substância ou terapêutica em seres humanos só podem ser confirmados através de testes com seres humanos.

As maiores limitações do nosso estudo foram ter sido levado a cabo em animais anestesiados (vd. Capítulo 4, Discussão), e não termos explorado os mecanismos responsáveis pela manutenção da função do corpo carotídeo no rato velho. Contudo, baseados nas observações da presente investigação e em estudos animais prévios, postulamos quw a compensação se faça no próprio corpo carotídeo como um todo

Nós estudámos aspectos funcionais atribuídos a receptores de dopamina e adenosina, mas não utilizámos técnicas de biologia molecular que nos permitissem observar a expressão dos receptores mencionados ao longo da idade.

Os fármacos foram testados em diferentes doses, confirmando-se um mecanismo dependente da dose. Se para os agonistas, o seu início e duração de acção *in vivo* era bem conhecido da experiência prévia do laboratório, já para os antagonistas, extrapolámos dados da literatura relativos às concentrações e a administrações por outras vias, eg. i.p. (Nakano H 2002), embora os parâmetros farmacocinéticos não estejam totalmente estabelecidos.

O veículo DMSO estimula o V_E (De la Torre & Rowed, 1974) e diminui a temperatura corporal (Orlando & Panuska, 1972). Contudo, como foi demonstrado (Figura 7.8. A), o V_E manteve-se constante, pelo menos durante o período experimental testado, e portanto acreditamos que o DMSO não afectou os nossos resultados, o que atribuímos à baixa concentração de DMSO utilizada. Quanto à temperatura, ela manteve-se constante graças à manta térmica utilizada.

A escolha do nosso modelo foi uma opção consciente dado que, apesar das limitações, as avaliações funcionais globais estão na prática mais próximas da utilidade terapêutica e desencadeiam interesse para explorar os mecanismos moleculares. Hoje em dia há mais informação sobre dados bioquímicos e

moleculares do que sobre a função em si: muitos são os estudos moleculares exaustivos dos quais não se extrapolam quaisquer alterações funcionais.

9.3 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O envelhecimento é a soma das alterações que ocorrem num organismo vivo com o passar do tempo, conduzindo a alterações funcionais, nomeadamente a capacidade para manter a homeostase, e à morte (Troen, 2003).

Apesar de não serem propriamente idênticas, as alterações relacionadas com a idade partilham traços comuns em todos os órgãos, incluindo perda de células parenquimatosas, aumento no tecido conectivo e depósito de colagénio, e diminuição do fluxo sanguíneo e capacidade funcional. As marcas moleculares são (i) alterações nos componentes extravasculares (i.e. matriz de colagénio, depósitos no sistema vascular), (ii) alterações no metabolismo celular (i.e. reparação de DNA, proteínas sentinela), bem como funcionalidade celular (i.e. senescência e morte celular) (Berne, 2004).

Contudo, há uma crescente evidência de que várias funções fisiológicas estão bem preservadas com a idade (vd. Capítulo 1.6).

A morte celular que ocorre no sistema nervoso na idade avançada é muito menos comum e mais selectiva do que anteriormente se pensava. Sendo os neurónios melhores sobreviventes do que o que nós realizávamos, é provável que o seu tempo de vida seja regulado activamente tanto no sistema nervoso maduro como no velho. Nos neurónios simpáticos do idoso, os padrões localizados de crescimento e atrofia dos axónios e dendrites, e a alteração da expressão dos neurotransmissores são as observações características, mas sem uma clara separação temporal com o que se passa nos estádios iniciais da vida adulta. Isto sugere que os neurónios dos animais velhos continuam a responder a diferentes estímulos, com maior ou menor sucesso, permitindo considerar o envelhecimento como integralmente ligado com o desenvolvimento (Cowen *et al.*, 1997).

O mecanismo neuroefector adrenérgico do músculo liso vascular não se degrada com a idade, ou seja a resposta contráctil à estimulação nervosa adrenérgica está bem preservada no envelhecimento, e o conteúdo em NA dos vasos permanece inalterada (Scott & Reid, 1982; Duckles *et al.*, 1985; Friedman & Duckles, 1994). No entanto, a libertação de NA das artérias da cauda do rato aumenta com a idade (Hajduczuk *et al.*, 1991b; Buchholz *et al.*, 1992a). Outros autores observaram que apesar dos níveis de NA e de TH, bem como do número de axónios simpáticos estarem nitidamente diminuídos com a idade,

aparentemente a utilização da NA pelos axónios simpáticos perivasculares existentes ocorre de uma forma semelhante aos axónios do adulto jovem (Dickason & Isaacson, 2002). Está demonstrado que a sensibilidade à NA de artérias isoladas de seres humanos dos 35 aos 83 anos de idade é semelhante, e a resposta contráctil à NA expressa na percentagem de resposta máxima ao KCl não se altera com a idade nestes vasos humanos (Scott & Reid, 1982). Esta estabilidade das respostas adrenérgicas vasculares com a idade também foi identificada noutros estudos clínicos (MacLennan *et al.*, 1980; Smith & Fasler, 1983). Os axónios simpáticos associados às artérias carótidas internas e cerebrais anteriores de ratos velhos são capazes de responder ao NGF exógeno com aumentos marcados de NA: não é observada nenhuma diminuição nesta resposta, sugerindo que estes neurónios são capazes do *uptake* e transporte da neurotrofina exógena (Dickason & Isaacson, 2002). Apesar do menor número de axónios associados aos vasos dos animais envelhecidos, os axónios existentes geram uma resposta geral semelhante ao adulto jovem, o qual tem maior número de axónios. Também a capacidade de produção de NA não se altera ao longo da idade, e até pode ser aumentada pela neurotrofina exógena (Dickason & Isaacson, 2002).

Não obstante a pressão parcial de O_2 e as diferenças alvéolo-arteriais das pressões de O_2 e CO_2 não diminuam com a idade, observa-se a nível pulmonar uma diminuição da capacidade de transferência do monóxido de carbono, o que indica uma limitação na difusão de O_2 no idoso, pelo menos quando o consumo de O_2 aumenta como durante a actividade muscular ou a febre (Guenard & Marthan, 1996). Contudo, outros estudos também em humanos demonstram uma diminuição da pressão parcial de O_2 e uma manutenção da pressão parcial de CO_2 com a idade (Gunnarsson *et al.*, 1996). Em ratos, Hajduczuk e col. não encontram diferenças nos valores dos gases do sangue entre os ratos velhos e os jovens (Hajduczuk *et al.*, 1991b).

A actividade do citrato sintetase, uma enzima mitocondrial e marcador do potencial oxidativo do músculo, não se revelou diferente entre o músculo estriado dos animais jovens e velhos (Behnke *et al.*, 2005).

O tempo de resposta máxima cardiovascular dos barorreceptores à massagem do seio carotídeo mantém-se constante ao longo da idade (Shi *et al.*, 1996)

É devidamente reconhecido que as mudanças fisiológicas que acompanham o envelhecimento causam alterações na biodisponibilidade dos fármacos (Goodman

et al., 2005), mas tem-se tornado evidente que o processo de envelhecimento não tem uma influência uniforme nos índices farmacocinéticos. Assim, o diazepam, a lidocaína e a prazosina são todos eliminados por metabolismo hepático, mas a sua clearance não se altera no idoso (Rubin *et al.*, 1981; Rubin *et al.*, 1982). De modo semelhante, o practolol e o atenolol, fármacos eliminados de forma inalterada pelo rim, também não sofrem alterações assinaláveis na sua biodisponibilidade ao longo da idade (Rubin *et al.*, 1982).

9.3.1 Corpo carotídeo

O corpo carotídeo representa um modelo experimental adequado para estudar os mecanismos de envelhecimento devido ao seu elevado fluxo sanguíneo e metabolismo relacionados com a função sensora de O₂ (Di Giulio *et al.*, 2003b), portanto servindo como um meio para perceber se as modificações no suprimento de O₂ às células através da hipoxia e/ou hiperoxia são capazes de modular o processo da idade.

Ao comparar os nossos resultados com os da literatura, temos de ter em mente que a função do corpo carotídeo ao longo da idade foi muito raramente examinada.

Os estudos da função do corpo carotídeo são frequentemente, e no homem exclusivamente, indirectos, sendo a função analisada pela resposta ventilatória à hipoxia. Os resultados destes estudos são contraditórios. Alguns autores demonstram uma diminuição da resposta ventilatória à hipoxia nos idosos (Kronenberg & Drage, 1973; Peterson *et al.*, 1981). Apesar de existirem indivíduos adultos e sem outra patologia, nos quais não se encontra resposta ventilatória à hipoxia (Kronenberg *et al.*, 1972), as únicas condições previamente associadas com atenuação da função quimiorreceptora são a hipoxia do nascimento, a exposição prolongada à hipoxia no adulto (Weil *et al.*, 1971), a condição física (Byrne-Quinn *et al.*, 1971) e a idade (Kronenberg & Drage, 1973). O padrão de atenuação da função quimiorreceptora é muito semelhante nas quatro situações, e sugere a possibilidade de alguns dos factores responsáveis pela perda da resposta ventilatória à hipoxia e hipercapnia se encontrem dentro dos próprios quimiorreceptores periféricos, ou nas vias de integração dos impulsos dos corpos carotídeos no sistema nervoso central. Não estando definida, nos estudos citados, qual a alteração nos impulsos do corpo carotídeo, a sua contribuição na resposta ventilatória à hipercapnia é perdida, enquanto que

a uma parte considerável da resposta ventilatória à hipoxia é mantida. Alguns estudos apoiam uma predisposição genética para uma resposta ventilatória reduzida à hipoxia (Tankersley *et al.*, 2000; Strohl & Thomas, 2001).

A resposta ventilatória a períodos de hipoxia mantida (FiO_2 de 8 a 10%) de 20 minutos é caracterizada por uma resposta bifásica: o V_E aumenta nos primeiros minutos, após o que diminui nos 10-15 minutos seguintes (fenómeno conhecido como declínio ventilatório à hipoxia, DVH) até atingir um novo *plateau*. Os quimiorreceptores periféricos dos corpos carotídeos parecem ser o factor chave no DVH. Apesar de se argumentar que em animais anestesiados os sinais com origem nos corpos carotídeos durante o DVH possam ser modificados no cérebro por neurotransmissores inibitórios como o GABA, acredita-se que em humanos conscientes a hipoxia mantida diminui a quimiossensibilidade periférica através de alterações físicas nos corpos carotídeos (Easton *et al.*, 1988; Bascom *et al.*, 1990). Também está descrita uma total ausência de diferença entre a resposta ventilatória à hipoxia mantida e sua recuperação ao longo da idade (Vovk *et al.*, 2004). A mulher pós-menopáusica possui os quimiorreflexos centrais diminuídos, mas não os quimiorreflexos periféricos (Preston *et al.*, 2009).

Schlenker e Goldman (Schlenker & Goldman, 1985) demonstraram que a ventilação atinge um nível mais elevado em resposta à hipoxia aos 12 meses em comparação com os ratos Wistar de 24 meses, mas a sensibilidade à hipoxia, medida do declive da recta do efeito da ventilação na tensão de oxigénio, permanece inalterada com a idade. Fukuda (Fukuda, 1992) revelou que a resposta ventilatória à hipoxia em animais de 20 meses está atenuada comparativamente com ratos de 1.5 meses. O autor atribui a referida atenuação ao mais baixo consumo de oxigénio, e não à função ineficaz do corpo carotídeo na idade avançada, uma vez que essa diminuição se perde quando o V_E é normalizado para metabolismo basal, o qual diminui com a idade. Wenninger e col não observaram alterações significativas, relacionadas com a idade, quer nas respostas ventilatórias à hipoxia, quer à hipercapnia no rato (Wenninger *et al.*, 2009).

Por isso, a função do corpo carotídeo na idade avançada permanece por esclarecer, e fora a sua provável dependência da morfologia do corpo carotídeo, também deve depender da espécie e das capacidades compensatórias da ventilação nas condições de hipoxia.

Podemos então constatar que os nossos resultados estão de acordo com parte da literatura citada acima, se bem que em desacordo com outros autores. Os motivos para essas diferenças não são imediatamente explicáveis. Talvez tenham a ver com diferenças metodológicas e com a complexa e ainda não totalmente entendida interacção entre os mecanismos ventilatórios centrais e periféricos, e o envelhecimento. Contudo, tendo estudado diferentes estímulos do corpo carotídeo ao longo da idade, nós expandimos a maioria das investigações neste assunto, demonstrando que a função do corpo carotídeo não se altera com a idade.

Há algumas explicações possíveis para o preservar da função do corpo carotídeo na idade avançada. Uma tem a ver com a presença de áreas de parênquima com células quimiorreceptoras razoavelmente bem preservadas, vizinhas de focos de células destruídas (Dymecka *et al.*, 2006). Pode ser que exista uma reserva de células quimiorreceptoras relativamente à função que desempenham, e nem todas elas normalmente sejam necessárias para a geração da resposta ventilatória à hipoxia. Isto pode ser uma reminiscência de algumas áreas de neurónios cerebrais, cujo número decresce progressivamente, com aceleração da sua diminuição à medida que a idade aumenta, o que não está necessariamente ligado a diminuição da função cerebral. No fim de contas, as células quimiorreceptoras do corpo carotídeo são de origem neuronal (Gonzalez *et al.*, 1994), e podem ter características inatas semelhantes. O número de células quimiorreceptoras suficiente para preencher a tarefa funcional da excitação à hipoxia, de modo que esta permaneça intacta, certamente varia entre os indivíduos e depende da idade e doutros factores ambientais de difícil controlo.

Podemos pensar que possa ser suficiente apenas uma fracção das células quimiorreceptoras funcionais para iniciar o quimiorreflexo, ou então que quanto menor o número de impulsos do NSC, maior a sua amplificação a nível do tronco cerebral para manter a resposta de hiperventilação.

A noção de um excedente de células quimiorreceptoras e da variabilidade no número de células que vão perdendo função, pode explicar os resultados divergentes observados em vários estudos relativamente à magnitude da resposta ventilatória à hipoxia nos humanos idosos. Como já foi referido, alguns autores registaram uma diminuição na resposta de mais de 50% comparada com os novos (Kronenberg & Drage, 1973; Peterson *et al.*, 1981), outros não verificaram alterações (Ahmed *et al.*, 1991; Pokorski & Marczak, 2003), e outros

autores até encontraram uma hiperventilação à hipoxia (Chapman & Cherniack, 1987; Pokorski & Antosiewicz, 2010).

Outra explicação pode ser o facto de na idade avançada, devido às alterações morfológicas, o corpo carotídeo ser exposto à hipoxia crónica. Isto é apoiado pelas camadas espessadas de tecido conjuntivo que rodeiam os lóbulos de células quimiorreceptoras, as quais limitam a velocidade de difusão do O_2 dos capilares para as células (Pokorski *et al.*, 2004). Esta hipoxia estagnante é um estímulo para as células quimiorreceptoras, aumentando o nível de activação celular e permitindo atingir um nível mais elevado de excitação nos quimiorreceptores sobreviventes. Esta hipoxia estagnante, se for controlada, pode ser uma potencial hipótese de manipulação para aumentar a reactividade do corpo carotídeo à hipoxia na idade avançada. A revitalização do corpo carotídeo, e consequentemente o aumento da libertação de O_2 com a ventilação pulmonar para o sangue arterial que conduz o O_2 aos tecidos, pode atenuar a diminuição das funções do organismo relacionadas com a hipoxia ao longo da idade.

Estas respostas ventilatórias mantidas nos ratos envelhecidos indicam que o sistema respiratório tem meios para compensar as possíveis alterações inconvenientes da idade a nível das estruturas nervosas e músculo-esqueléticas.

Os efeitos da idade na acumulação de cAMP noutras preparações demonstram uma diminuição que a actividade da subunidade catalítica da adenilatociclase cardíaca em ratos (Kilts *et al.*, 2002), e também no coração de humanos com idade superior a 60 anos (Brodde *et al.*, 1995). Contudo, e de modo contrário, tem sido descrito que na medula supra-renal e no fígado a capacidade da forskolina em aumentar o cAMP atinge o seu máximo nos ratos de 24 meses (Turner *et al.*, 1968a). Bem como no córtex cerebral o agonista A_{2A} CGS 21680 aumentou a acumulação de cAMP nos ratos velhos (Lopes *et al.*, 1999a), e no miocárdio de rato a idade influencia a transcrição dos receptores A_2 em sentidos opostos: aumenta a nível dos A_{2B} e reduz a nível dos A_{2A} (Willems *et al.*, 2005).

Se no corpo carotídeo coexiste uma redução nas respostas mediadas tanto por receptores A_2 de adenosina (acoplados positivamente à adenilatociclase) como por receptores D_2 de dopamina (acoplados negativamente à adenilatociclase), isso significaria que tomariam lugar efeitos compensadores na produção de cAMP.

A descoberta que as alterações no conteúdo de cAMP do corpo carotídeo em resposta a diferentes concentrações de O₂ não se altera com a idade, mais uma vez sugere que o mecanismo compensador pode ocorrer dentro do corpo carotídeo como um todo.

Estes resultados contrastam com a redução dos impulsos do NSC em resposta à hipoxia em ratos velhos (Conde *et al.*, 2006b). É sabido que o nervo glossofaríngeo contém, paralelamente às fibras aferentes do NSC, uma via eferente parassimpática sensível à hipoxia, e fonte inibitória do corpo carotídeo (Campanucci *et al.*, 2006). Poderemos especular que a redução dos impulsos do NSC observada nos animais velhos (Conde *et al.*, 2006b) possa ser devida principalmente à diminuição da actividade das fibras eferentes, sem alteração da via quimiossensora aferente excitatória. De modo semelhante, foi demonstrado em humanos que a idade diminui as respostas autonómicas à dor, mas não modifica a percepção nociceptiva (Hajduczuk *et al.*, 1991b).

9.3.2 Sistema adrenérgico

Na realidade, os resultados obtidos no presente trabalho com dopamina e adenosina exógenas, bem como aqueles obtidos manipulando os seus efeitos endógenos através de antagonistas respectivos, demonstraram que nem os receptores de dopamina nem os de adenosina estão alterados de modo significativo nos animais velhos. Os efeitos da dopamina e da adenosina observados eram mediados através dos quimiorreceptores do corpo carotídeo, uma vez que estas acções desapareciam após a secção bilateral do NSC.

Dado que a domperidona é um antagonista selectivo dos receptores D₂ de dopamina que não passa a BHE (Baudry *et al.*, 1979) e tem sido muito usado pelos investigadores para o estudo dos mecanismos dopaminérgicos, nós usámo-la para examinar a nossa hipótese no presente estudo.

Quaisquer dos efeitos observados da dopamina devem ser atribuídos a receptores D₂, dado que limitámos o campo do nosso estudo aos seus efeitos nos receptores D₂ periféricos. Apesar de a domperidona ser administrada sistemicamente, nós podemos atribuir os efeitos observados à sua acção no corpo carotídeo.

Existem estudos com resultados contraditórios relativamente aos efeitos da domperidona na ventilação, nomeadamente alguns autores observam que a administração de domperidona não afecta o V_E durante a ventilação normoxica,

quer em ratos (Nakano *et al.*, 2002), quer em humanos (Delpierre *et al.*, 1987); enquanto que outros indicam que a domperidona aumenta a resposta ventilatória à hipoxia em ratos e gatos (Wach *et al.*, 1989; Tatsumi *et al.*, 1995).

No presente trabalho, a domperidona ao ser administrada isoladamente aumenta o V_E basal, tal como já descrito previamente (Lahiri *et al.*, 1984; Gamboa *et al.*, 2003), e nós encontrámos diferença estatisticamente significativa entre ratos de 3 e 24 meses. Este facto significa que o tónus basal inibitório da dopamina na actividade do corpo carotídeo é menos pronunciado nos ratos velhos, provavelmente resultante da diminuição do número de receptores de dopamina ao longo da idade. Esta constatação não é inesperada tendo em consideração que a perda de receptores D_2 de dopamina se tornou numa das alterações mais descritas e reproduzíveis durante o envelhecimento, bem como num biomarcador potente da idade biológica.

A perda de receptores D_2 de dopamina no estriado ao longo da idade que tem sido observada em várias espécies e nos humanos (Govoni *et al.*, 1978; Joseph *et al.*, 1978), é aparentemente devida à perda de neurónios contendo receptores D_2 de dopamina, e à diminuição da síntese proteica destes receptores nos neurónios sobreviventes (Morelli *et al.*, 1990; Mesco *et al.*, 1993; Roth & Joseph, 1994b).

Para além do estriado, também o número de receptores D_2 de dopamina diminui em todas as regiões do cérebro (Kaasinen *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001).

Do mesmo modo, é bem sabido que o envelhecimento conduz a uma diminuição marcada nos receptores D_2 de dopamina a nível do coração e da parede das coronárias (Cavallotti *et al.*, 2002a).

Em consonância com a perda dos receptores D_2 , também no rato velho está descrita uma diminuição do disparo neuronal mediada por receptores D_1 quer no córtex pré-frontal (Parfitt *et al.*, 1990), quer a nível do estriado (Memo *et al.*, 1980). Apesar da densidade dos receptores D_1 no hipocampo não se alterar com a idade, os níveis de dopamina diminuem e aumenta a actividade na fosfodiesterase tipo IV, a qual promove a degradação do cAMP (Luo & Roth, 2000). A nível renal, assiste-se a uma diminuição dos locais de ligação D_1 , bem como defeito na ligação às proteínas G e na activação da PKA no rim (Beheray *et al.*, 2000).

A nível cerebral, a redução dos receptores D_1 e D_2 de dopamina com a idade é específica de certas áreas dopaminérgicas, e é mais pronunciada onde os receptores de dopamina são mais abundantes (Morelli *et al.*, 1990).

Em ratos, foi demonstrado um aumento com a idade dos receptores D_3 de dopamina no estriado e *nucleus accumbens* (Wallace & Booze, 1996).

De qualquer modo, esta eventual redução de receptores de dopamina a nível do corpo carotídeo não é suficiente para reduzir o efeito da dopamina exógena, a qual se revelou da mesma magnitude nos ratos envelhecidos e nos seus controlos. Este resultado está de acordo com a observação por Friedman *et al.* de que não existe uma alteração ao longo da idade da inibição neuronal das respostas contrácteis vasculares ou da libertação de NA mediadas por receptores D_2 de dopamina (Friedman & Duckles, 1994).

A resposta da PA desencadeada pela dopamina, ou seja um aumento de curta duração seguida de um regresso à linha de base, ocorreu independentemente da aferência no NSC ou bloqueio dos receptores D_2 de dopamina.

9.3.3 Sistema purinérgico

A adenosina e o seu metabolito fosforilado ATP têm consensualmente efeitos excitatórios na actividade dos quimiorreceptores periféricos tanto em animais como no homem. Em relação ao efeito excitatório da adenosina na respiração, sabe-se que o receptor que medeia o efeito excitatório da adenosina no corpo carotídeo é o receptor do subtipo A_{2A} (McQueen & Ribeiro, 1986; Monteiro & Ribeiro, 1987; Conde & Monteiro, 2004), e este efeito é mediado através dos quimiorreceptores do corpo carotídeo, uma vez que esta acção desaparece após a secção bilateral dos NSCs (Monteiro & Ribeiro, 1987).

A adenosina, apesar do efeito dispneico mediado pela activação dos quimiorreceptores (Burki *et al.*, 2005), é uma ferramenta clinicamente útil para a terapêutica da taquicardia supraventricular (Biaggioni *et al.*, 1987; Riccardi *et al.*, 2008), uma disritmia cardíaca comum, mais frequentemente observada no idoso (Medi *et al.*, 2009). Contudo, faltam estudos sobre este efeito nos indivíduos idosos.

No presente trabalho, o efeito inibitório da adenosina na FC e PA (Monteiro & Ribeiro, 1987; Monteiro & Ribeiro, 1991) não apresenta a mesma magnitude nos ratos velhos e seus controlos após injeção de doses elevadas de adenosina (100nm), sendo mais pronunciado nos ratos de 3 meses.

Apesar do presente trabalho não estar focado nos efeitos crono/dromo e batmotrópico da adenosina, é uma descoberta interessante o menor efeito bradicárdico decorrente da sua administração exógena em animais velhos,

sugerindo que a eficácia da adenosina para reverter a taquicardia supraventricular possa estar atenuada no idoso. Este facto pode ser atribuído a uma redução da densidade dos receptores de adenosina no coração envelhecido, e também pode envolver uma redução, relacionada com a idade, na habilidade intrínseca do tecido nodal para responder à activação dos receptores de adenosina (Hinschen *et al.*, 2001).

Apesar de estudos no coração de coelhos velhos revelarem um aumento na densidade dos receptores A_1 , com o consequente aumento da sensibilidade do coração senescente à acção inotrópica negativa da adenosina (Mudumbi *et al.*, 1995a), e em ratos o envelhecimento aumentar a adenosina intersticial provavelmente pelo aumento da concentração de adenosina 5'-monofosfato do miocárdio e da sensibilidade e arritmogénese dos receptores A_1 , e reduzir a sensibilidade dos receptores A_2 (Headrick, 1996), Hinschen e col. não encontraram alterações relacionadas com a idade na bradicardia mediada por receptores A_1 de adenosina (Hinschen *et al.*, 2000)

Por outro lado, há uma evidência crescente apoiando uma diminuição da função dos receptores A_1 com a idade. Por exemplo, tem sido descrito que as acções anti-adrenérgicas da adenosina em membranas ventriculares diminuem com a idade (Gao *et al.*, 1997), o mesmo se passando com a inibição pré-sináptica da libertação de NA mediada pelos receptores A_1 (Snyder *et al.*, 1998). Também Jenner e col. observam uma diminuição ao longo da idade na expressão dos receptores A_1 e A_{2A} , enquanto que os níveis de mRNA para os receptores A_{2B} e A_3 não se alteram (Jenner *et al.*, 2004).

Outros autores descrevem que, apesar de estar mantida a densidade dos receptores A_1 de adenosina e estarem mantidos os níveis de proteína $G\alpha$, a função ventricular do rato diminui com a idade, sendo este facto atribuído à redução da ligação dos receptores A_1 de adenosina às suas proteínas G (Cai *et al.*, 1997). A redução, relacionada com a idade, da vasodilatação dos vasos coronários mediada pela adenosina pode envolver uma diminuição dependente da idade na capacidade intrínseca do tecido vascular em responder à activação dos receptores de adenosina (Hinschen *et al.*, 2001). De facto, a vasodilatação induzida pelos receptores A_{2A} e A_{2B} , mas não pelos A_{3A} é reduzida ao longo da idade (Rose'Meyer *et al.*, 2003).

No hipocampo de rato foi observado um aumento da concentração de adenosina de cerca de 61% nos animais velhos, bem como um aumento muito significativo

da actividade da 5-nucleotidase, a qual participa parcialmente na síntese de adenosina; estes factos são consistentes com um aumento da actividade purinérgica endógena ao longo da idade (Jin *et al.*, 1993).

Os efeitos excitatórios da adenosina com a mesma magnitude encontrados nos ratos velhos sugerem que os receptores A_2 de adenosina do corpo carotídeo se encontram bem preservados, e que o desconforto torácico causado pela sua administração exógena se mantém no idoso.

O SCH 58261, antagonista competitivo, específico e selectivo dos receptores A_{2A} de adenosina (Belardinelli *et al.*, 1996; Dionisotti *et al.*, 1996), quando usado em concentrações ≤ 20 nM (Zocchi *et al.*, 1996a; Zocchi *et al.*, 1996b), impede os efeitos na respiração da adenosina administrada exogenamente, corroborando os trabalhos já citados acima neste capítulo (McQueen & Ribeiro, 1986; Monteiro & Ribeiro, 1987; Conde & Monteiro, 2004).

Os efeitos excitatórios na ventilação obtidos com baixas doses de SCH 58261, antagonista dos receptores A_{2A} de adenosina que passa a BHE (El yacoubi *et al.*, 2000), quando administrado sozinho, estão de acordo com a presença de receptores A_{2A} com efeitos inibitórios no controlo da ventilação (Mayer *et al.*, 2006), e que este controlo inibitório central é aparentemente mais relevante em condições basais do que os efeitos excitatórios mediados periféricamente. Além disso, sabe-se que em áreas como o córtex e hipocampo existe uma diminuição dos receptores A_1 e um aumento da ligação de agonistas aos receptores A_{2A} de adenosina ao longo do envelhecimento (Cunha *et al.*, 1995; Rebola *et al.*, 2003), e a eficácia da ligação dos agonistas A_1 diminui (Sebastiao *et al.*, 2000a). Para além de um aumento da densidade e eficiência dos receptores A_{2A} no córtex límbico dos ratos envelhecidos (Lopes *et al.*, 1999a), também foi demonstrada uma redução na densidade e eficiência dos receptores A_1 (Cunha *et al.*, 1995), e que o efeito neuromodulador da adenosina depende de uma activação balanceada A_1/A_{2A} (Cunha *et al.*, 1994).

De acordo com os nossos resultados, as alterações dos receptores de adenosina a nível do controlo central da ventilação, se existirem, mantêm as mesmas proporções e eficiência A_1/A_{2A} .

Pensa-se portanto, que baixas doses de antagonistas dos receptores A_{2A} de adenosina que passem a BHE como o SCH 58261 possam ser úteis para reverter depressões respiratórias resultantes de mecanismos centrais, sem acções *major*

no sistema cardiovascular porque as doses que antagonizam os efeitos ventilatórios não modificaram a PA e a FC.

A acção antagonista receptora – receptor A_{2A} – D_2 não parece estar modificada com a idade (Popoli *et al.*, 1998a). Alguns resultados experimentais sugerem a existência de uma interacção antagonística A_{2A} – D_2 ao nível da adenilatociclase, através da qual os receptores D_2 de dopamina inibiriam tonicamente os efeitos do cAMP induzidos pelos receptores A_{2A} de adenosina (Ferre *et al.*, 1997).

De acordo com alguns estudos, não há alterações significativas do conteúdo de dopamina a nível do estriado ao longo da idade (Emerich *et al.*, 1993; Popoli *et al.*, 1998a). Contudo, existem resultados diferentes, indicando uma diminuição do conteúdo dopamina no estriado de ratos velhos (Friedemann & Gerhardt, 1992)

Estão descritos aumentos significativos do conteúdo de adenosina no estriado e hipocampo de rato (Jin *et al.*, 1993; Popoli *et al.*, 1998a); mas também redução da densidade de receptores A_{2A} de adenosina no estriado, bem como de RNA, no rato velho (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1993). Cunha *et al.* demonstraram um aumento do número de receptores A_{2A} no córtex cerebral e em menor extensão no hipocampo, se bem que reduzido no estriado. O mesmo estudo também revelou uma diminuição do número de receptores A_1 no hipocampo e córtex ao longo da idade, mas uma diferença não apreciável no estriado entre ratos velhos e adultos jovens (Cunha *et al.*, 1995).

Apesar da redução da densidade de receptores de A_{2A} de adenosina no estriado, observa-se no rato o mesmo efeito inibitório do CGS 21680 no efluxo de aminoácidos excitatórios ao longo da idade (Corsi *et al.*, 1999). Esta constatação pode ser atribuída ao facto de não só os receptores A_{2A} , mas também os D_2 estarem reduzidos no estriado dos ratos velhos (Popoli *et al.*, 1998a).

Os resultados presentes sugerem fortemente a existência de um desequilíbrio adenosina vs dopamina a favor da adenosina, o qual envolve tanto mecanismos pré-sinápticos como pós-sinápticos.

Um aumento do tonus da adenosina opondo-se à transmissão dopaminérgica, envolvendo pelo menos a neurotransmissão mediada por receptores D_2 de dopamina, pode ser uma varável importante envolvendo défices motores associados à idade.

Em resumo, nós observámos que o controlo periférico da ventilação não está diminuído com a idade. No corpo carotídeo, o tónus dopaminérgico endógeno

inibitório está ligeiramente reduzido. Contudo, a diminuição da ventilação causada pela dopamina exógena está preservada nos animais velhos, e deve ser tomada em conta nas situações de cuidados intensivos. O efeito excitatório da adenosina exógena mediado pelos receptores A_{2A} a nível dos quimiossensores do corpo carotídeo não se modificou com a idade. De modo contrário, o efeito bradicárdico da adenosina exógena mediado pelos receptores A_1 de adenosina encontra-se atenuado nos ratos velhos. Estes resultados reduzem o interesse clínico da adenosina para reverter a taquicardia supraventricular no idoso.

A manutenção da função do corpo carotídeo através da idade aponta este órgão como um modelo adequado de um envelhecimento com sucesso.

9.4 APLICAÇÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Dado o papel central dos neurónios dopaminérgicos na doença de Parkinson, tem havido muito interesse em desenvolver uma terapêutica de transplante através da qual as células doentes seriam substituídas por células dopaminérgicas funcionantes. De facto, ao longo dos anos, têm sido investigados diferentes tipos de células, desde cerebrais de feto, células dopaminérgicas porcinas, células de corpo carotídeo, até células estaminais embrionárias, células estaminais neuronais e células modificadas geneticamente. Muitas mostraram eficácia em modelos animais e algumas foram experimentadas em doentes, mas por enquanto ainda nenhuma resultou numa aplicação alargada em doentes.

O corpo carotídeo oferece uma fonte autóloga de células estaminais. As células glómicas são dopaminérgicas e contêm grande quantidade de factor neurotrófico derivado das células da glia (GDNF).

De estudos prévios, sabe-se que o autotransplante de agregados celulares de corpo carotídeo melhora os sintomas nos doentes com doença de Parkinson, sendo a integridade histológica do corpo carotídeo na idade avançada e a escassez de tecido factores de limitação *major* para esta terapêutica (Arjona *et al.*, 2003). O facto do presente trabalho indicar que a função do corpo carotídeo não se deteriora com a idade pode estimular o entusiasmo na utilização do corpo carotídeo na doença de Parkinson.

Adicionalmente, dados experimentais recentes sugerem que as células tipo II são *stem cells* que em resposta à hipoxia podem diferenciar-se em novas células glómicas (Pardal *et al.*, 2010). Neste contexto, outros estudos importantes seriam explorar a função das células tipo II ao longo da idade, nomeadamente no que diz respeito à produção de factores neurotróficos.

Para aprofundar o conhecimento da evolução do corpo carotídeo ao longo da idade seria muito interessante estudar o ATP, outro neurotransmissor excitatório. Os nossos dados apontam para uma função mantida do corpo carotídeo ao longo da idade, mas claramente as várias dimensões funcionais homeostáticas do corpo carotídeo e o seu processo de quimiotransdução desencadeado por vários estímulos necessita de posterior investigação no envelhecimento.

Tal como os resultados obtidos com a dopamina e a adenosina, com este modelo *in vivo* torna-se fácil testar outros fármacos agonistas e antagonistas de receptores existentes no corpo carotídeo, ao longo da idade.

Dado que o corpo carotídeo é um receptor de *stress*, a avaliação desse órgão após um estímulo crônico poderá dar um conhecimento profundo sobre as modificações estruturais e funcionais que se correlacionam com o processo de envelhecimento. Estas condições experimentais podem ser úteis em afirmar definitivamente se o corpo carotídeo pode ser usado como modelo para o estudo dos processos de envelhecimento.

LISTA DE REFERÊNCIAS

Abbott CP, De Burgh DM, & Howe A (1972). Early ultrastructural changes in the carotid body after degenerative section of the carotid sinus nerve in the cat. *Acta Anat (Basel)* **83**, 161-185.

Acker H (1994a). Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol* **95**, 1-10.

Acker H (1994b). Cellular oxygen sensors. *Ann N Y Acad Sci* **718**, 3-10.

Acker H (1987). Importance of oxygen supply in the carotid body for chemoreception. *Biomed Biochim Acta* **46**, 885-898.

Acker H, Bolling B, Delpiano MA, Dufau E, Gorlach A, & Holtermann G (1992). The meaning of H₂O₂ generation in carotid body cells for PO₂ chemoreception. *J Auton Nerv Syst* **41**, 41-51.

Acker H, Dufau E, Huber J, & Sylvester D (1989). Indications to an NADPH oxidase as a possible pO₂ sensor in the rat carotid body. *FEBS Lett* **256**, 75-78.

Acker H & Eyzaguirre C (1987). Light absorbance changes in the mouse carotid body during hypoxia and cyanide poisoning. *Brain Res* **409**, 380-385.

Acker H & Lubbers DW (1975). Proceedings: Relationship between local flow and tissue PO₂ in the carotid body of the cat. *Arzneimittelforschung* **25**, 1672.

Acker H & O'Regan RG (1981). The effects of stimulation of autonomic nerves on carotid body blood flow in the cat. *J Physiol* **315**, 99-110.

Acker H & Starlinger H (1984). Adenosine triphosphate content in the cat carotid body under different arterial O₂ and CO₂ conditions. *Neurosci Lett* **50**, 175-179.

Ahmed M, Giesbrecht GG, Serrette C, Georgopoulos D, & Anthonisen NR (1991). Ventilatory response to hypoxia in elderly humans. *Respir Physiol* **83**, 343-351.

Alcayaga J, Iturriaga R, & Zapata P (1986). Carotid body chemoreceptor excitation produced by carotid occlusion. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* **36**, 199-215.

Alcayaga J, Sanhueza Y, & Zapata P (1993). Thermal dependence of chemosensory activity in the carotid body superfused in vitro. *Brain Res* **600**, 103-111.

Allen AM (1998). Angiotensin AT₁ receptor-mediated excitation of rat carotid body chemoreceptor afferent activity. *J Physiol* **510** (Pt 3), 773-781.

Almaraz L, Gonzalez C, & Obeso A (1986). Effects of high potassium on the release of [3H]dopamine from the cat carotid body in vitro. *J Physiol* **379**, 293-307.

Aminoff MJ & Sears TA (1971). Spinal integration of segmental, cortical and breathing inputs to thoracic respiratory motoneurons. *J Physiol* **215**, 557-575.

Anand A & Paintal AS (1980). Reflex effects following selective stimulation of J receptors in the cat. *J Physiol* **299**, 553-572.

Anand A, Paintal AS, & Whitteridge D (1993). Mechanisms underlying enhanced responses of J receptors of cats to excitants in pulmonary oedema. *J Physiol* **471**, 535-547.

Andrews WH, Deane BM, Howe A, & Orbach J (1972). Abdominal chemoreceptors in the rat. *J Physiol* **222**, 84P-85P.

Andronikou S, Shirahata M, Mokashi A, & Lahiri S (1988). Carotid body chemoreceptor and ventilatory responses to sustained hypoxia and hypercapnia in the cat. *Respir Physiol* **72**, 361-374.

Angel A & Harris MC (1998). The effect of chemoreceptor stimulation on the centripetal transfer of somatosensory information in the urethane-anaesthetized rat. *Neuroscience* **86**, 321-335.

Archer S & Michelakis E (2002). The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *News Physiol Sci* **17**, 131-137.

Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, & Weir EK (1993). A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res* **73**, 1100-1112.

Archer SL, London B, Hampl V, Wu X, Nsair A, Puttagunta L, Hashimoto K, Waite RE, & Michelakis ED (2001). Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *FASEB J* **15**, 1801-1803.

Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, Dinanuer MC, & Weir EK (1999). O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7944-7949.

Arjona V, Minguez-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, Pardal R, Mendez-Ferrer S, Martin JM, Perez M, Katati MJ, Valencia E, Garcia T, & Lopez-

- Barneo J (2003). Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* **53**, 321-328.
- Bairam A & Carroll JL (2005). Neurotransmitters in carotid body development. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 217-232.
- Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, Johnson RA, Watters JJ, & Mitchell GS (2004). BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat Neurosci* **7**, 48-55.
- Bamford OS, Sterni LM, Wasicko MJ, Montrose MH, & Carroll JL (1999). Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. *Am J Physiol* **276**, L875-L884.
- Band DM & Linton RA (1986). The effect of potassium on carotid body chemoreceptor discharge in the anaesthetized cat. *J Physiol* **381**, 39-47.
- Barbe C, Al-Hashem F, Conway AF, Dubuis E, Vandier C, & Kumar P (2002). A possible dual site of action for carbon monoxide-mediated chemoexcitation in the rat carotid body. *J Physiol* **543**, 933-945.
- Barnett S, Mulligan E, Wagerle LC, & Lahiri S (1988). Measurement of carotid body blood flow in cats by use of radioactive microspheres. *J Appl Physiol* **65**, 2484-2489.
- Baron M & Eyzaguirre C (1977). Effects of temperature on some membrane characteristics of carotid body cells. *Am J Physiol* **233**, C35-C46.
- Baron M & Eyzaguirre C (1975). Thermal responses of carotid body cells. *J Neurobiol* **6**, 521-527.
- Bascom DA, Clement ID, Cunningham DA, Painter R, & Robbins PA (1990). Changes in peripheral chemoreflex sensitivity during sustained, isocapnic hypoxia. *Respir Physiol* **82**, 161-176.
- Batuca JR, Monteiro TC, & Monteiro EC (2003). Contribution of dopamine D₂ receptors for the cAMP levels at the carotid body. *Adv Exp Med Biol* **536**, 367-373.
- Baudry M, Martres MP, & Schwartz JC (1979). 3H-Domperidone: a selective ligand for dopamine receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **308**, 231-237.
- Bayliss DA, Talley EM, Sirois JE, & Lei Q (2001). TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol* **129**, 159-174.

- Beheray S, Kansra V, Hussain T, & Lokhandwala MF (2000). Diminished natriuretic response to dopamine in old rats is due to an impaired D₁-like receptor-signaling pathway. *Kidney Int* **58**, 712-720.
- Behnke BJ, Delp MD, Dougherty PJ, Musch TI, & Poole DC (2005). Effects of aging on microvascular oxygen pressures in rat skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol* **146**, 259-268.
- Belardinelli L, Shryock JC, Ruble J, Monopoli A, Dionisotti S, Ongini E, Dennis DM, & Baker SP (1996). Binding of the novel nonxanthine A_{2A} adenosine receptor antagonist [3H]SCH58261 to coronary artery membranes. *Circ Res* **79**, 1153-1160.
- Beneke S & Burkle A (2007). Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing. *Nucleic Acids Res* **35**, 7456-7465.
- Benot AR & Lopez-Barneo J (1990). Feedback Inhibition of Ca²⁺ Currents by Dopamine in Glomus Cells of the Carotid Body. *Eur J Neurosci* **2**, 809-812.
- Berger AJ (1979). Phrenic motoneurons in the cat: subpopulations and nature of respiratory drive potentials. *J Neurophysiol* **42**, 76-90.
- Bernard DG, Li A, & Nattie EE (1996). Evidence for central chemoreception in the midline raphe. *J Appl Physiol* **80**, 108-115.
- Bernardi L, Passino C, Serebrovskaya Z, Serebrovskaya T, & Appenzeller O (2001). Respiratory and cardiovascular adaptations to progressive hypoxia; effect of interval hypoxic training. *Eur Heart J* **22**, 879-886.
- Berne RM (2004). *Physiology*, Updated 5th ed ed. Mosby, St. Louis, Mo.
- Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, & Eadie MJ (1997). Anticonvulsant therapy in aged patients. Clinical pharmacokinetic considerations. *Drugs Aging* **10**, 278-289.
- Berridge MJ (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* **17**, 491-500.
- Berridge MJ (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13-26.
- Beukers MW, den DH, van Tilburg EW, Brouwer J, & Ijzerman AP (2000). Why are A(2B) receptors low-affinity adenosine receptors? Mutation of Asn273 to Tyr increases affinity of human A(2B) receptor for 2-(1-Hexynyl)adenosine. *Mol Pharmacol* **58**, 1349-1356.
- Bhat SG, Wilson M, & Ramkumar V (1998). Age-dependent reductions in A₁ adenosine receptor expression in rat testes. *Am J Physiol* **274**, C1057-C1064.

- Biaggioni I, Olafsson B, Robertson RM, Hollister AS, & Robertson D (1987). Cardiovascular and respiratory effects of adenosine in conscious man. Evidence for chemoreceptor activation. *Circ Res* **61**, 779-786.
- Bianchi AL, avit-Saubie M, & Champagnat J (1995b). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* **75**, 1-45.
- Bianchi AL, avit-Saubie M, & Champagnat J (1995a). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* **75**, 1-45.
- Biscoe TJ (1971). Carotid body: structure and function. *Physiol Rev* **51**, 437-495.
- Biscoe TJ, Bradley GW, & Purves MJ (1970a). The relation between carotid body chemoreceptor discharge, carotid sinus pressure and carotid body venous flow. *J Physiol* **208**, 99-120.
- Biscoe TJ & Duchen MR (1990a). Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *Am J Physiol* **258**, L271-L278.
- Biscoe TJ & Duchen MR (1990b). Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. *J Physiol* **428**, 39-59.
- Biscoe TJ, Duchen MR, Eisner DA, O'Neill SC, & Valdeolmillos M (1989). Measurements of intracellular Ca^{2+} in dissociated type I cells of the rabbit carotid body. *J Physiol* **416**, 421-434.
- Biscoe TJ & Millar RA (1968). Effects of inhalation anaesthetics on carotid body chemoreceptor activity. *Br J Anaesth* **40**, 2-12.
- Biscoe TJ, Purves MJ, & Sampson SR (1970b). The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded in vivo with intact circulation. *J Physiol* **208**, 121-131.
- Black AM, McCloskey DI, & Torrance RW (1971). The responses of carotid body chemoreceptors in the cat to sudden changes of hypercapnic and hypoxic stimuli. *Respir Physiol* **13**, 36-49.
- Blaustein MP & Lederer WJ (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* **79**, 763-854.
- Bock P (1980). Adenine nucleotides in the carotid body. *Cell Tissue Res* **206**, 279-290.

- Boden AG, Harris MC, & Parkes MJ (2000). The preoptic area in the hypothalamus is the source of the additional respiratory drive at raised body temperature in anaesthetised rats. *Exp Physiol* **85**, 527-537.
- Bolser DC, Lindsey BG, & Shannon R (1987). Medullary inspiratory activity: influence of intercostal tendon organs and muscle spindle endings. *J Appl Physiol* **62**, 1046-1056.
- Bowie MW & Slattum PW (2007). Pharmacodynamics in older adults: a review. *Am J Geriatr Pharmacother* **5**, 263-303.
- Bradford A, O'Regan RG, Nolan P, & McKeogh D (1994). Laryngeal receptors are sensitive to expiratory concentrations of CO₂. *Adv Exp Med Biol* **360**, 385-387.
- Brischetto MJ, Millman RP, Peterson DD, Silage DA, & Pack AI (1984). Effect of aging on ventilatory response to exercise and CO₂. *J Appl Physiol* **56**, 1143-1150.
- Britto RR, Zampa CC, de Oliveira TA, Prado LF, & Parreira VF (2009). Effects of the aging process on respiratory function. *Gerontology* **55**, 505-510.
- Brodde OE, Zerkowski HR, Schranz D, Broede-Sitz A, Michel-Reher M, Schafer-Beisenbusch E, Piotrowski JA, & Oelert H (1995). Age-dependent changes in the beta-adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* **26**, 20-26.
- Brophy S, Ford TW, Carey M, & Jones JF (1999). Activity of aortic chemoreceptors in the anaesthetized rat. *J Physiol* **514** (Pt 3), 821-828.
- Bruce EN & Cherniack NS (1987). Central chemoreceptors. *J Appl Physiol* **62**, 389-402.
- Buchholz J, Tsai H, Friedman D, & Duckles SP (1992). Influence of age on control of norepinephrine release from the rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther* **260**, 722-727.
- Buchholz JN, Behringer EJ, Pottorf WJ, Pearce WJ, & Vanterpool CK (2007). Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging Cell* **6**, 285-296.
- Buckler KJ (1997). A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *J Physiol* **498** (Pt 3), 649-662.
- Buckler KJ (1999). Background leak K⁺-currents and oxygen sensing in carotid body type I cells. *Respir Physiol* **115**, 179-187.
- Buckler KJ & Vaughan-Jones RD (1994b). Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *J Physiol* **476**, 423-428.

- Buckler KJ & Vaughan-Jones RD (1994a). Effects of hypercapnia on membrane potential and intracellular calcium in rat carotid body type I cells. *J Physiol* **478** (Pt 1), 157-171.
- Buckler KJ & Vaughan-Jones RD (1993). Effects of acidic stimuli on intracellular calcium in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *Pflugers Arch* **425**, 22-27.
- Buckler KJ & Vaughan-Jones RD (1998). Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *J Physiol* **513** (Pt 3), 819-833.
- Buckler KJ, Vaughan-Jones RD, Peers C, Lagadic-Gossmann D, & Nye PC (1991a). Effects of extracellular pH, PCO₂ and. *J Physiol* **444**, 703-721.
- Buckler KJ, Vaughan-Jones RD, Peers C, & Nye PC (1991b). Intracellular pH and its regulation in isolated type I carotid body cells of the neonatal rat. *J Physiol* **436**, 107-129.
- Buckler KJ, Williams BA, & Honore E (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* **525 Pt 1**, 135-142.
- Buerk DG, Nair PK, & Whalen WJ (1989a). Evidence for second metabolic pathway for O₂ from PtiO₂ measurements in denervated cat carotid body. *J Appl Physiol* **67**, 1578-1584.
- Buerk DG, Nair PK, & Whalen WJ (1989b). Two-cytochrome metabolic model for carotid body PtiO₂ and chemosensitivity changes after hemorrhage. *J Appl Physiol* **67**, 60-68.
- Burger RE, Estavillo JA, Kumar P, Nye PC, & Paterson DJ (1988). Effects of potassium, oxygen and carbon dioxide on the steady-state discharge of cat carotid body chemoreceptors. *J Physiol* **401**, 519-531.
- Burki NK, Dale WJ, & Lee LY (2005). Intravenous adenosine and dyspnea in humans. *J Appl Physiol* **98**, 180-185.
- Busse MW, Maassen N, & Konrad H (1991). Relation between plasma K⁺ and ventilation during incremental exercise after glycogen depletion and repletion in man. *J Physiol* **443**, 469-476.
- Busselberg D, Bischoff AM, Paton JF, & Richter DW (2001). Reorganisation of respiratory network activity after loss of glycinergic inhibition. *Pflugers Arch* **441**, 444-449.
- Butera RJ, Jr., Rinzel J, & Smith JC (1999a). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J Neurophysiol* **82**, 382-397.

Butera RJ, Jr., Rinzel J, & Smith JC (1999b). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations Of coupled pacemaker neurons. *J Neurophysiol* **82**, 398-415.

Byrne-Quinn E, Weil JV, Sodal IE, Filley GF, & Grover RF (1971). Ventilatory control in the athlete. *J Appl Physiol* **30**, 91-98.

Cachero TG, Rigual R, Rocher A, & Gonzalez C (1996). Cholera and pertussis toxins reveal multiple regulation of cAMP levels in the rabbit carotid body. *Eur J Neurosci* **8**, 2320-2327.

Cai G, Wang HY, Gao E, Horwitz J, Snyder DL, Pelleg A, Roberts J, & Friedman E (1997). Reduced adenosine A₁ receptor and G alpha protein coupling in rat ventricular myocardium during aging. *Circ Res* **81**, 1065-1071.

Campanucci VA, Zhang M, Vollmer C, & Nurse CA (2006). Expression of multiple P2X receptors by glossopharyngeal neurons projecting to rat carotid body O₂-chemoreceptors: role in nitric oxide-mediated efferent inhibition. *J Neurosci* **26**, 9482-9493.

Canet E, Kianicka I, & Praud JP (1996). Postnatal maturation of peripheral chemoreceptor ventilatory response to O₂ and CO₂ in newborn lambs. *J Appl Physiol* **80**, 1928-1933.

Capasso L, D'Anastasio R, Pierfelice L, Di Fabrizio A, & Gallenga PE (2003). Roman conquest, lifespan, and diseases in ancient Italy. *Lancet* **362**, 668.

Cardenas H & Zapata P (1981). Dopamine-induced ventilatory depression in the rat, mediated by carotid nerve afferents. *Neurosci Lett* **24**, 29-33.

Carnes BA, Olshansky SJ, & Grahn D (2003). Biological evidence for limits to the duration of life. *Biogerontology* **4**, 31-45.

Carpenter E & Peers C (2001). A standing Na⁺ conductance in rat carotid body type I cells. *Neuroreport* **12**, 1421-1425.

Carrillo MC, Kitani K, Kanai S, Sato Y, Nokubo M, Ohta M, & Otsubo K (1989). Differences in the influence of diet on hepatic glutathione S-transferase activity and glutathione content between young and old C57 black female mice. *Mech Ageing Dev* **47**, 1-15.

Carroll JL (2003). Developmental plasticity in respiratory control. *J Appl Physiol* **94**, 375-389.

Carroll JL, Bamford OS, & Fitzgerald RS (1993). Postnatal maturation of carotid chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ in the cat. *J Appl Physiol* **75**, 2383-2391.

- Carroll JL, Boyle KM, Wasicko MJ, & Sterni LM (2005). Dopamine D₂ receptor modulation of carotid body type 1 cell intracellular calcium in developing rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L910-L916.
- Carroll JL & Kim I (2005). Postnatal development of carotid body glomus cell O₂ sensitivity. *Respir Physiol Neurobiol* **149**, 201-215.
- Carta AR, Tabrizi MA, Baraldi PG, Pinna A, Pala P, & Morelli M (2003). Blockade of A_{2A} receptors plus l-DOPA after nigrostriatal lesion results in GAD67 mRNA changes different from l-DOPA alone in the rat globus pallidus and substantia nigra reticulata. *Exp Neurol* **184**, 679-687.
- Casals G, Ros J, Sionis A, Davidson MM, Morales-Ruiz M, & Jimenez W (2009). Hypoxia induces B-type natriuretic peptide release in cell lines derived from human cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H550-H555.
- Catelli M, Feldman J, Bousquet P, & Tibirica E (2003). Protective effects of centrally acting sympathomodulatory drugs on myocardial ischemia induced by sympathetic overactivity in rabbits. *Braz J Med Biol Res* **36**, 85-95.
- Cavallotti C, Nuti F, Bruzzzone P, & Mancone M (2002). Age-related changes in dopamine D₂ receptors in rat heart and coronary vessels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 412-418.
- Cerveri I, Zoia MC, Fanfulla F, Spagnolatti L, Berrayah L, Grassi M, & Tinelli C (1995). Reference values of arterial oxygen tension in the middle-aged and elderly. *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 934-941.
- Chan ED & Welsh CH (1998). Geriatric respiratory medicine. *Chest* **114**, 1704-1733.
- Chandel NS & Schumacker PT (2000). Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* **88**, 1880-1889.
- Chapman KR & Cherniack NS (1987). Aging effects on the interaction of hypercapnia and hypoxia as ventilatory stimuli. *J Gerontol* **42**, 202-209.
- Chen J, Dinger B, & Fidone SJ (1997). cAMP production in rabbit carotid body: role of adenosine. *J Appl Physiol* **82**, 1771-1775.
- Chen J, He L, Dinger B, & Fidone S (2000). Cellular mechanisms involved in rabbit carotid body excitation elicited by endothelin peptides. *Respir Physiol* **121**, 13-23.
- Chen WY & Chang MS (2009). IL-20 is regulated by hypoxia-inducible factor and up-regulated after experimental ischemic stroke. *J Immunol* **182**, 5003-5012.

- Chen Y, Tjong YW, Ip SF, Tipoe GL, & Fung ML (2005). Melatonin enhances the hypoxic response of rat carotid body chemoreceptor. *J Pineal Res* **38**, 157-163.
- Cheng PM & Donnelly DF (1995). Relationship between changes of glomus cell current and neural response of rat carotid body. *J Neurophysiol* **74**, 2077-2086.
- Cheng Z, Guo SZ, Lipton AJ, & Gozal D (2002). Domoic acid lesions in nucleus of the solitary tract: time-dependent recovery of hypoxic ventilatory response and peripheral afferent axonal plasticity. *J Neurosci* **22**, 3215-3226.
- Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, & Doyle FJ, III (1997). A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors. *J Auton Nerv Syst* **67**, 1-14.
- Chiocchio SR, Biscardi AM, & Tramezzani JH (1967). 5-hydroxytryptamine in the carotid body of the cat. *Science* **158**, 790-791.
- Choi DW (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* **23**, 1261-1276.
- Chou CL & Shirahata M (1996). Two types of voltage-gated K channels in carotid body cells of adult cats. *Brain Res* **742**, 34-42.
- Chow CM, Winder C, & Read DJ (1986). Influences of endogenous dopamine on carotid body discharge and ventilation. *J Appl Physiol* **60**, 370-375.
- Chugh DK, Katayama M, Mokashi A, Bebout DE, Ray DK, & Lahiri S (1994). Nitric oxide-related inhibition of carotid chemosensory nerve activity in the cat. *Respir Physiol* **97**, 147-156.
- Ciarka A, Cuylits N, Vachier JL, Lamotte M, Degaute JP, Naeije R, & van de BP (2006). Increased peripheral chemoreceptors sensitivity and exercise ventilation in heart transplant recipients. *Circulation* **113**, 252-257.
- Clapham DE (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.
- Coates EL, Li A, & Nattie EE (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* **75**, 5-14.
- Cohen MI (1979). Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev* **59**, 1105-1173.
- Coleridge HM, Coleridge JC, & Howe A (1970). Thoracic chemoreceptors in the dog. A histological and electrophysiological study of the location, innervation and blood supply of the aortic bodies. *Circ Res* **26**, 235-247.

Coles LS (2005). Validated worldwide supercentenarians for 2004. *Rejuvenation Res* **8**, 69-71.

Conde S, Obeso A, Monteiro E, Rigual R, & Gonzalez C (2006a). [Caffeine inhibits chemoreceptor responses to hypoxia.]. *Rev Port Pneumol* **12**, 56-57.

Conde SV, Gonzalez C, Batuca JR, Monteiro EC, & Obeso A (2008). An antagonistic interaction between A_{2B} adenosine and D₂ dopamine receptors modulates the function of rat carotid body chemoreceptor cells. *J Neurochem* **107**, 1369-1381.

Conde SV & Monteiro EC (2004). Hypoxia induces adenosine release from the rat carotid body. *J Neurochem* **89**, 1148-1156.

Conde SV, Obeso A, Monteiro EC, & Gonzalez C (2009). The A(2B)-D(2) receptor interaction that controls carotid body catecholamines release locates between the last two steps of hypoxic transduction cascade. *Adv Exp Med Biol* **648**, 161-168.

Conde SV, Obeso A, Rigual R, Monteiro EC, & Gonzalez C (2006b). Function of the rat carotid body chemoreceptors in ageing. *J Neurochem* **99**, 711-723.

Conde SV, Obeso A, Vicario I, Rigual R, Rocher A, & Gonzalez C (2006c). Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors. *J Neurochem* **98**, 616-628.

Corsi C, Melani A, Bianchi L, & Pedata F (2000). Striatal A_{2A} adenosine receptor antagonism differentially modifies striatal glutamate outflow in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* **11**, 2591-2595.

Corsi C, Melani A, Bianchi L, Pepeu G, & Pedata F (1999). Striatal A_{2A} adenosine receptors differentially regulate spontaneous and K⁺-evoked glutamate release in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* **10**, 687-691.

Cowen T & Gavazzi I (1998). Plasticity in adult and ageing sympathetic neurons. *Prog Neurobiol* **54**, 249-288.

Cowen T, Jenner C, Song GX, Santoso AW, & Gavazzi I (1997). Responses of mature and aged sympathetic neurons to laminin and NGF: an in vitro study. *Neurochem Res* **22**, 1003-1011.

Critchley JA, Ellis P, Henderson CG, & Ungar A (1982). The role of the pituitary-adrenocortical axis in reflex responses of the adrenal medulla of the dog 2. *J Physiol* **323**, 533-541.

Critchley JA, Ellis P, & Ungar A (1980). The reflex release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal glands of cats and dogs. *J Physiol* **298**, 71-78.

- Cross AR, Henderson L, Jones OT, Delpiano MA, Hentschel J, & Acker H (1990). Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO₂ sensor protein in the rat carotid body. *Biochem J* **272**, 743-747.
- Cummins TR, Dib-Hajj SD, Waxman SG, & Donnelly DF (2002). Characterization and developmental changes of Na⁺ currents of petrosal neurons with projections to the carotid body. *J Neurophysiol* **88**, 2993-3002.
- Cunha RA, Almeida T, & Ribeiro JA (2001). Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats. *J Neurochem* **76**, 372-382.
- Cunha RA, Constantino MC, Sebastiao AM, & Ribeiro JA (1995). Modification of A₁ and A_{2a} adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. *Neuroreport* **6**, 1583-1588.
- Cunha RA, Milusheva E, Vizi ES, Ribeiro JA, & Sebastiao AM (1994). Excitatory and inhibitory effects of A₁ and A_{2A} adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem* **63**, 207-214.
- Cutz E, Fu XW, Yeger H, & Nurse CA (2009). Functional live imaging of the pulmonary neuroepithelial body microenvironment. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**, 119-120.
- Cutz E & Jackson A (1999). Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. *Respir Physiol* **115**, 201-214.
- D'Angelo E, Prandi E, D'Angelo E, & Pecchiari M (2003). Lung-deflating ability of rib cage and abdominal muscles in rabbits. *Respir Physiol Neurobiol* **135**, 17-24.
- Daly MD & Jones JF (1998). Respiratory modulation of carotid and aortic body reflex left ventricular inotropic responses in the cat. *J Physiol* **509** (Pt 3), 895-907.
- Daly MD, ngell-James JE, & Elsner R (1979). Role of carotid-body chemoreceptors and their reflex interactions in bradycardia and cardiac arrest. *Lancet* **1**, 764-767.
- Dasso LL, Buckler KJ, & Vaughan-Jones RD (2000). Interactions between hypoxia and hypercapnic acidosis on calcium signaling in carotid body type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L36-L42.
- Daudu PA, Rozanov C, Roy A, Mokashi A, & Lahiri S (2000). Effects of 2,4-dinitrophenol (DNP) on the relationship between the chemosensory activities of the rat carotid body and the intracellular calcium of glomus cells. *Adv Exp Med Biol* **475**, 655-661.

- De Burgh D, Lambertsen CJ, & Schweitzer A (1954). Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat. *J Physiol* **125**, 67-89.
- De Daly MB & Scott MJ (1958). The effects of stimulation of the carotid body chemoreceptors on heart rate in the dog. *J Physiol* **144**, 148-166.
- De la Torre JC & Rowed DW (1974). DMSO: a new respiratory stimulant? *J Clin Pharmacol* **14**, 345-353.
- De Magalhaes JP (2004). From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing. *Exp Cell Res* **300**, 1-10.
- De Castro F (2009a). The discovery of sensory nature of the carotid bodies--invited article. *Adv Exp Med Biol* **648**, 1-18.
- De Castro F (2009b). Towards the sensory nature of the carotid body: hering, de castro and heymansdagger. *Front Neuroanat* **3**, 23.
- De Troyer A, Cappello M, Meurant N, & Scillia P (2003). Synergism between the canine left and right hemidiaphragms. *J Appl Physiol* **94**, 1757-1765.
- De TA, Kirkwood PA, & Wilson TA (2005). Respiratory action of the intercostal muscles. *Physiol Rev* **85**, 717-756.
- Dean JB, Bayliss DA, Erickson JT, Lawing WL, & Millhorn DE (1990). Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarii by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. *Neuroscience* **36**, 207-216.
- Dean JB, Kinkade EA, & Putnam RW (2001). Cell-cell coupling in CO₂/H⁺-excited neurons in brainstem slices. *Respir Physiol* **129**, 83-100.
- Dejours P (1962). Chemoreflexes in breathing. *Physiol Rev* **42**, 335-358.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, & Vincent JL (2008). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* **36**, 296-327.
- Delpiano MA & Acker H (1984). O₂ chemoreception of the cat carotid body in vitro. *Adv Exp Med Biol* **169**, 705-717.

- Delpierre S, Fornaris M, Guillot C, & Grimaud C (1987). Increased ventilatory chemosensitivity induced by domperidone, a dopamine antagonist, in healthy humans. *Bull Eur Physiopathol Respir* **23**, 31-35.
- Demetrius L (2004). Caloric restriction, metabolic rate, and entropy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **59**, B902-B915.
- Dempsey JA, Forster HV, Birnbaum ML, Reddan WG, Thoden J, Grover RF, & Rankin J (1972). Control of exercise hyperpnea under varying durations of exposure to moderate hypoxia. *Respir Physiol* **16**, 213-231.
- Dev NB & Loeschcke HH (1979). Topography of the respiratory and circulatory responses to acetylcholine and nicotine on the ventral surface of the medulla oblongata. *Pflugers Arch* **379**, 19-27.
- Di Giulio C, Bianchi G, Cacchio M, Macri MA, Ferrero G, Rapino C, Verratti V, Piccirilli M, & Artese L (2003a). Carotid body HIF-1 α , VEGF and NOS expression during aging and hypoxia. *Adv Exp Med Biol* **536**, 603-610.
- Di Giulio C, Cacchio M, Bianchi G, Rapino C, & Di IC (2003b). Selected contribution: Carotid body as a model for aging studies: is there a link between oxygen and aging? *J Appl Physiol* **95**, 1755-1758.
- Di Giulio C, Di MM, Sabatino G, Spoletini L, Amicarelli F, Di IC, & Modesti A (1998). Effect of chronic hyperoxia on young and old rat carotid body ultrastructure. *Exp Gerontol* **33**, 319-329.
- Di Nardo F, Burattini R, Cogo CE, Faelli E, & Ruggeri P (2009). Age-related analysis of insulin resistance, body weight and arterial pressure in the Zucker fatty rat. *Exp Physiol* **94**, 162-168.
- Dickason AK & Isaacson LG (2002). Plasticity of aged perivascular axons following exogenous NGF: analysis of catecholamines. *Neurobiol Aging* **23**, 125-134.
- DiMarco AF, Supinski GS, & Budzinska K (1989). Inspiratory muscle interaction in the generation of changes in airway pressure. *J Appl Physiol* **66**, 2573-2578.
- Dimkpa U & Ibhazehiebo K (2009). Assessment of the influence of age on the rate of heart rate decline after maximal exercise in non-athletic adult males. *Clin Physiol Funct Imaging* **29**, 68-73.
- Diogenes MJ, ssaife-Lopes N, Pinto-Duarte A, Ribeiro JA, & Sebastiao AM (2007). Influence of age on BDNF modulation of hippocampal synaptic transmission: interplay with adenosine A_{2A} receptors. *Hippocampus* **17**, 577-585.

- Dionisotti S, Ferrara S, Molta C, Zocchi C, & Ongini E (1996). Labeling of A_{2A} adenosine receptors in human platelets by use of the new nonxanthine antagonist radioligand [3H]SCH 58261. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 1209-1214.
- Dirks AJ & Leeuwenburgh C (2006). Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. *Mech Ageing Dev* **127**, 1-7.
- Dobson JG, Jr., Fenton RA, & Romano FD (1990). Increased myocardial adenosine production and reduction of beta-adrenergic contractile response in aged hearts. *Circ Res* **66**, 1381-1390.
- Donnelly DF (1993). Electrochemical detection of catecholamine release from rat carotid body in vitro. *J Appl Physiol* **74**, 2330-2337.
- Donnelly DF (1996). Chemoreceptor nerve excitation may not be proportional to catecholamine secretion. *J Appl Physiol* **81**, 657-664.
- Donnelly DF (1995a). Does catecholamine secretion mediate the hypoxia-induced increase in nerve activity? *Biol Signals* **4**, 304-309.
- Donnelly DF (1995b). Modulation of glomus cell membrane currents of intact rat carotid body. *J Physiol* **489** (Pt 3), 677-688.
- Donnelly DF & Doyle TP (1994). Developmental changes in hypoxia-induced catecholamine release from rat carotid body, in vitro. *J Physiol* **475**, 267-275.
- Douglas WW, Innes IR, & Kosterlitz HW (1950). The vasomotor responses due to electrical stimulation of the sinus and vagus nerves of the cat and their modification by large doses of sodium pentobarbital (nembutal). *J Physiol* **111**, 215-230.
- Drew B & Leeuwenburgh C (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 66-81.
- Drew B & Leeuwenburgh C (2003). Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R1259-R1267.
- Duchen MR & Biscoe TJ (1992b). Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J Physiol* **450**, 13-31.
- Duchen MR & Biscoe TJ (1992a). Relative mitochondrial membrane potential and [Ca²⁺]_i in type I cells isolated from the rabbit carotid body. *J Physiol* **450**, 33-61.

- Duchen MR, Caddy KW, Kirby GC, Patterson DL, Ponte J, & Biscoe TJ (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* **26**, 291-311.
- Duckles SP, Carter BJ, & Williams CL (1985). Vascular adrenergic neuroeffector function does not decline in aged rats. *Circ Res* **56**, 109-116.
- Duffin J (2004). Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp Physiol* **89**, 517-529.
- Duffin J & Lipski J (1987). Monosynaptic excitation of thoracic motoneurons by inspiratory neurones of the nucleus tractus solitarius in the cat. *J Physiol* **390**, 415-431.
- Duke HN, Green JH, & Neil E (1952). Carotid chemoceptor impulse activity during inhalation of carbon monoxide mixtures. *J Physiol* **118**, 520-527.
- Dunin-Barkowski WL, Escobar AL, Lovering AT, & Orem JM (2003). Respiratory pattern generator model using Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in neurons shows both pacemaker and reciprocal network properties. *Biol Cybern* **89**, 274-288.
- Dutschmann M & Herbert H (1996). The Kolliker-Fuse nucleus mediates the trigeminally induced apnoea in the rat. *Neuroreport* **7**, 1432-1436.
- Dymecka A, Walski M, & Pokorski M (2006). Ultrastructural degradation of the carotid body in the aged rat: is there a role for atherosclerosis in the main carotid arteries? *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 4**, 85-90.
- Eager KR, Robinson BJ, Galletly DC, & Miller JH (1994). Endogenous opioid modulation of hypercapnic-stimulated respiration in the rat. *Respir Physiol* **96**, 13-24.
- Easton J & Howe A (1983). The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. *Cell Tissue Res* **232**, 349-356.
- Easton PA, Slykerman LJ, & Anthonisen NR (1988). Recovery of the ventilatory response to hypoxia in normal adults. *J Appl Physiol* **64**, 521-528.
- Eden GJ & Hanson MA (1987). Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J Physiol* **392**, 1-9.
- El YM, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, & Vaugeois JM (2000). The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A(2A) adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* **148**, 153-163.

- Emerich DF, McDermott P, Krueger P, Banks M, Zhao J, Marszalkowski J, Frydel B, Winn SR, & Sanberg PR (1993). Locomotion of aged rats: relationship to neurochemical but not morphological changes in nigrostriatal dopaminergic neurons. *Brain Res Bull* **32**, 477-486.
- Ethier MF, Hickler RB, & Dobson JG, Jr. (1989). Aging increases adenosine and inosine release by human fibroblast cultures. *Mech Ageing Dev* **50**, 159-168.
- Eyzaguirre C (2000). Carotid body gap junctions: secretion of transmitters and possible electric coupling between glomus cells and nerve terminals. *Adv Exp Med Biol* **475**, 349-357.
- Eyzaguirre C & Koyano H (1965). Effects of hypoxia, hypercapnia, and pH on the chemoreceptor activity of the carotid body in vitro. *J Physiol* **178**, 385-409.
- Eyzaguirre C & Lewin J (1961a). Chemoreceptor activity of the carotid body of the cat. *J Physiol* **159**, 222-237.
- Eyzaguirre C & Lewin J (1961b). Effect of different oxygen tensions on the carotid body in vitro. *J Physiol* **159**, 238-250.
- Eyzaguirre C & Zapata P (1984). Perspectives in carotid body research. *J Appl Physiol* **57**, 931-957.
- Ezure K, Tanaka I, & Miyazaki M (1998). Pontine projections of pulmonary slowly adapting receptor relay neurons in the cat. *Neuroreport* **9**, 411-414.
- Fadic R, Larrain C, & Zapata P (1991). Thermal effects on ventilation in cats: participation of carotid body chemoreceptors. *Respir Physiol* **86**, 51-63.
- Fay FS (1970). Oxygen consumption of the carotid body. *Am J Physiol* **218**, 518-523.
- Fearon IM, Thompson RJ, Samjoo I, Vollmer C, Doering LC, & Nurse CA (2002). O₂-sensitive K⁺ channels in immortalised rat chromaffin-cell-derived MAH cells. *J Physiol* **545**, 807-818.
- Feldman JL & Gautier H (1976). Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *J Neurophysiol* **39**, 31-44.
- Feldman JL, Mitchell GS, & Nattie EE (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* **26**, 239-266.
- Feldman JL, Smith JC, & Liu G (1991). Respiratory pattern generation in mammals: in vitro en bloc analyses. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 590-594.

- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, & Fuxe K (1997). Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **20**, 482-487.
- Fidone S & Gonzalez C (1982). Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J Physiol* **333**, 69-79.
- Fidone S, Gonzalez C, & Yoshizaki K (1982). Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro. *J Physiol* **333**, 93-110.
- Fidone SJ & Sato A (1969). A study of chemoreceptor and baroreceptor A and C-fibres in the cat carotid nerve. *J Physiol* **205**, 527-548.
- Fidone SJ, Wang ZZ, Chen J, He L, Wang WJ, Dinger B, & Stensaas LJ (1993). Carotid sinus nerve inhibition mediated by atrial natriuretic peptide. *Adv Exp Med Biol* **337**, 271-278.
- Fieber LA & McCleskey EW (1993). L-type calcium channels in type I cells of the rat carotid body. *J Neurophysiol* **70**, 1378-1384.
- Field KJ, White WJ, & Lang CM (1993). Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Lab Anim* **27**, 258-269.
- Filosa JA, Dean JB, & Putnam RW (2002). Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* **541**, 493-509.
- Fiocchi R, Fagard R, Vanhees L, Grauwels R, & Amery A (1985). Carotid baroreflex sensitivity and physical fitness in cycling tourists. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **54**, 461-465.
- Fitzgerald RS (2000). Oxygen and carotid body chemotransduction: the cholinergic hypothesis - a brief history and new evaluation. *Respir Physiol* **120**, 89-104.
- Fitzgerald RS & Parks DC (1971). Effect of hypoxia on carotid chemoreceptor response to carbon dioxide in cats. *Respir Physiol* **12**, 218-229.
- Fitzgerald RS, Rogus EM, & Dehghani A (1977). Catecholamines and 3',5' cyclic AMP in carotid body chemoreception in the cat. *Adv Exp Med Biol* **78**, 245-258.
- Fitzgerald RS & Shirahata M (1994). Acetylcholine and carotid body excitation during hypoxia in the cat. *J Appl Physiol* **76**, 1566-1574.
- Fitzgerald RS, Shirahata M, & Chang I (2006). The impact of PCO₂ and H⁺ on the release of acetylcholine from the cat carotid body. *Neurosci Lett* **397**, 205-209.

- Fitzgerald RS, Shirahata M, & Lahiri S (1990). Amiloride and carotid body chemoreception of hypercapnia and hypoxia. *Respir Physiol* **81**, 337-347.
- Fitzgerald RS, Shirahata M, & Wang HY (1999). Acetylcholine release from cat carotid bodies. *Brain Res* **841**, 53-61.
- Flecknell PA (1993). Anaesthesia of animals for biomedical research. *Br J Anaesth* **71**, 885-894.
- Fleg JL, O'Connor F, Gerstenblith G, Becker LC, Clulow J, Schulman SP, & Lakatta EG (1995). Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women. *J Appl Physiol* **78**, 890-900.
- Forster RE (1993). Carbonic anhydrase and the carotid body. *Adv Exp Med Biol* **337**, 137-147.
- Franchini KG, Oliveira VL, & Krieger EM (1997). Hemodynamics of chemoreflex activation in unanesthetized rats. *Hypertension* **30**, 699-703.
- Frank NR, Mead J, & Ferris BG, Jr. (1957). The mechanical behavior of the lungs in healthy elderly persons. *J Clin Invest* **36**, 1680-1687.
- Fredholm BB (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* **14**, 1315-1323.
- Friedemann MN & Gerhardt GA (1992). Regional effects of aging on dopaminergic function in the Fischer-344 rat. *Neurobiol Aging* **13**, 325-332.
- Friedman DJ & Duckles SP (1994). Influence of age on control of norepinephrine release: Ca^{2+} channels and dopamine D_2 receptors. *Eur J Pharmacol* **252**, 1-9.
- Fu XW, Nurse CA, & Cutz E (2004). Expression of functional purinergic receptors in pulmonary neuroepithelial bodies and their role in hypoxia chemotransmission. *Biol Chem* **385**, 275-284.
- Fu XW, Nurse CA, Farragher SM, & Cutz E (2003). Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in neuroepithelial bodies of neonatal hamster lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L1203-L1212.
- Fu XW, Nurse CA, Wong V, & Cutz E (2002). Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit. *J Physiol* **539**, 503-510.

- Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinanuer MC, & Cutz E (2000). NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4374-4379.
- Fu XW, Wang D, Pan J, Farragher SM, Wong V, & Cutz E (2001). Neuroepithelial bodies in mammalian lung express functional serotonin type 3 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L931-L940.
- Fujishiro N, Endo Y, Warashina A, & Inoue M (2004). Mechanisms for hypoxia detection in O₂-sensitive cells. *Jpn J Physiol* **54**, 109-123.
- Fukuda Y (1991). Maintenance of ventilatory control by CO₂ in the rat during growth and aging. *Pflugers Arch* **419**, 38-42.
- Fukuda Y (1992). Changes in ventilatory response to hypoxia in the rat during growth and aging. *Pflugers Arch* **421**, 200-203.
- Fukuda Y, Sato A, & Trzebski A (1987). Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst* **19**, 1-11.
- Fung ML, Lam SY, Chen Y, Dong X, & Leung PS (2001). Functional expression of angiotensin II receptors in type-I cells of the rat carotid body. *Pflugers Arch* **441**, 474-480.
- Gallego R & Belmonte C (1979). The effects of blood osmolality changes on cat carotid body chemoreceptors in vivo. *Pflugers Arch* **380**, 53-58.
- Gallego R, Eyzaguirre C, & Monti-Bloch L (1979). Thermal and osmotic responses of arterial receptors. *J Neurophysiol* **42**, 665-680.
- Gamboa J, Macarlupu JL, Rivera-Chira M, Monge C, & Leon-Velarde F (2003). Effect of domperidone on ventilation and polycythemia after 5 weeks of chronic hypoxia in rats. *Respir Physiol Neurobiol* **135**, 1-8.
- Ganforina MD & Lopez-Barneo J (1991). Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2927-2930.
- Ganforina MD & Lopez-Barneo J (1992a). Potassium channel types in arterial chemoreceptor cells and their selective modulation by oxygen. *J Gen Physiol* **100**, 401-426.

- Ganformina MD & Lopez-Barneo J (1992b). Gating of O₂-sensitive K⁺ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modifications induced by low PO₂. *J Gen Physiol* **100**, 427-455.
- Gao E, Snyder DL, Johnson MD, Friedman E, Roberts J, & Horwitz J (1997). The effect of age on adenosine A₁ receptor function in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 593-602.
- Garcia-Sancho J, Sanchez A, & Herreros B (1979). Stimulation of monovalent cation fluxes by electron donors in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta* **556**, 118-130.
- Gauda EB (2002). Gene expression in peripheral arterial chemoreceptors. *Microsc Res Tech* **59**, 153-167.
- Gauda EB, Cooper R, Johnson SM, McLemore GL, & Marshall C (2004). Autonomic microganglion cells: a source of acetylcholine in the rat carotid body. *J Appl Physiol* **96**, 384-391.
- Getting PA (1989). Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annu Rev Neurosci* **12**, 185-204.
- Ginty DD (1997). Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial? *Neuron* **18**, 183-186.
- Goldberg LI (1974). Dopamine-clinical uses of an endogenous catecholamine. *N Engl J Med* **291**, 707-710.
- Gomez-Nino A, Almaraz L, & Gonzalez C (1992). Potentiation by cyclooxygenase inhibitors of the release of catecholamines from the rabbit carotid body and its reversal by prostaglandin E₂. *Neurosci Lett* **140**, 1-4.
- Gomez-Nino A, Almaraz L, & Gonzalez C (1994a). In vitro activation of cyclo-oxygenase in the rabbit carotid body: effect of its blockade on [3H]catecholamine release. *J Physiol* **476**, 257-267.
- Gomez-Nino A, Lopez-Lopez JR, Almaraz L, & Gonzalez C (1994b). Inhibition of [3H]catecholamine release and Ca²⁺ currents by prostaglandin E₂ in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol* **476**, 269-277.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, & Rigual R (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* **74**, 829-898.
- Gonzalez C, Sanz-Alfayate G, Agapito MT, Gomez-Nino A, Rocher A, & Obeso A (2002). Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **132**, 17-41.

- Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Lazo JS, & Parker KL (2005). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 11th ed ed. McGraw-Hill, New York.
- Goormaghtigh N (1936). On the Existence of Abdominal Vagal Paraganglia in the Adult Mouse. *J Anat* **71**, 77-90.
- Gordon CJ (2008). Cardiac and thermal homeostasis in the aging Brown Norway rat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 1307-1313.
- Goshgarian HG (2003). The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol* **94**, 795-810.
- Gourine AV (2005). On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol* **568**, 715-724.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, & Spyer KM (2005a). Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci* **25**, 1211-1218.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, & Spyer KM (2005b). ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* **436**, 108-111.
- Govoni S, Spano PF, & Trabucchi M (1978). [3H]Haloperidol and [3H]spiroperidol binding in rat striatum during ageing. *J Pharm Pharmacol* **30**, 448-449.
- Gray BA (1968). Response of the perfused carotid body to changes in pH and PCO₂. *Respir Physiol* **4**, 229-245.
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, & Feldman JL (2001). Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* **4**, 927-930.
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, & Feldman JL (1999). Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* **286**, 1566-1568.
- Green DA, Bowtell J, & Turner DL (2008). Electrical percutaneous tibial stimulation modulates within-a-breath respiratory drive in man. *Respir Physiol Neurobiol* **161**, 214-217.
- Gribbin B, Pickering TG, Sleight P, & Peto R (1971). Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. *Circ Res* **29**, 424-431.

- Griffith WH, Jasek MC, Bain SH, & Murchison D (2000). Modification of ion channels and calcium homeostasis of basal forebrain neurons during aging. *Behav Brain Res* **115**, 219-233.
- Grimes PA, Mokashi A, Stone RA, & Lahiri S (1995). Nitric oxide synthase in autonomic innervation of the cat carotid body. *J Auton Nerv Syst* **54**, 80-86.
- Guenard H & Marthan R (1996). Pulmonary gas exchange in elderly subjects. *Eur Respir J* **9**, 2573-2577.
- Gunawardena S, Ravi K, Longhurst JC, Kaufman MP, Ma A, Bravo M, & Kappagoda CT (2002). Responses of C fiber afferents of the rabbit airways and lungs to changes in extra-vascular fluid volume. *Respir Physiol Neurobiol* **132**, 239-251.
- Gunnarsson L, Tokics L, Brismar B, & Hedenstierna G (1996). Influence of age on circulation and arterial blood gases in man. *Acta Anaesthesiol Scand* **40**, 237-243.
- Guyenet PG, Bayliss DA, Mulkey DK, Stornetta RL, Moreira TS, & Takakura AT (2008). The retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *Adv Exp Med Biol* **605**, 327-332.
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, & Schumacker PT (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* **1**, 401-408.
- Habeck JO (1986). Morphological findings at the carotid bodies of humans suffering from different types of systemic hypertension or severe lung diseases. *Anat Anz* **162**, 17-27.
- Haddad GG & Jiang C (1997). O₂-sensing mechanisms in excitable cells: role of plasma membrane K⁺ channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 23-42.
- Hagen TM, Yowe DL, Bartholomew JC, Wehr CM, Do KL, Park JY, & Ames BN (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3064-3069.
- Hagerdal M, Morgan CW, Sumner AE, & Gutsche BB (1983). Minute ventilation and oxygen consumption during labor with epidural analgesia. *Anesthesiology* **59**, 425-427.
- Hajduczuk G, Chapleau MW, & Abboud FM (1991a). Increase in sympathetic activity with age. II. Role of impairment of cardiopulmonary baroreflexes. *Am J Physiol* **260**, H1121-H1127.
- Hajduczuk G, Chapleau MW, Johnson SL, & Abboud FM (1991b). Increase in sympathetic activity with age. I. Role of impairment of arterial baroreflexes. *Am J Physiol* **260**, H1113-H1120.

- Haji A, Okazaki M, Yamazaki H, & Takeda R (2002). Physiological properties of late inspiratory neurons and their possible involvement in inspiratory off-switching in cats. *J Neurophysiol* **87**, 1057-1067.
- Haji A, Remmers JE, Connelly C, & Takeda R (1990). Effects of glycine and GABA on bulbar respiratory neurons of cat. *J Neurophysiol* **63**, 955-965.
- Hanacek J, Tatar M, & Widdicombe J (2006). Regulation of cough by secondary sensory inputs. *Respir Physiol Neurobiol* **152**, 282-297.
- Hanbauer I & Lovenberg W (1977). Presence of a calcium²⁺-dependent activator of cyclic-nucleotide phosphodiesterase in rat carotid body: effects of hypoxia. *Neuroscience* **2**, 603-607.
- Hansen JT & Yates RD (1975). Light, fluorescence and electron microscopic studies of rabbit subclavian glomera. *Am J Anat* **144**, 477-489.
- Hanson G, Jones L, & Fidone S (1986). Physiological chemoreceptor stimulation decreases enkephalin and substance P in the carotid body. *Peptides* **7**, 767-769.
- Hanson MA, Nye PC, Rao PS, & Torrance RW (1978). Effects of acetazolamide and benzolamide on the response of the carotid chemoreceptors to CQ₂ [proceedings]. *J Physiol* **284**, 165P-166P.
- Harden FA, Brown L, Quinn RJ, Harrison GJ, Headrick JP, Rose'Meyer RB, & Willis RJ (2002). Study of the novel non-xanthine heterocyclic compound GU285 as a potent non-selective adenosine receptor antagonist in the rat. *Arzneimittelforschung* **52**, 175-181.
- Hardy JC, Gray K, Whisler S, & Leuenberger U (1994). Sympathetic and blood pressure responses to voluntary apnea are augmented by hypoxemia. *J Appl Physiol* **77**, 2360-2365.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Harman D (1972). Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr* **25**, 839-843.
- Harper ME, Monemdjou S, Ramsey JJ, & Weindruch R (1998). Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes. *Am J Physiol* **275**, E197-E206.
- Harris MB & Milsom WK (2003). Apneusis follows disruption of NMDA-type glutamate receptors in vagotomized ground squirrels. *Respir Physiol Neurobiol* **134**, 191-207.

- Hart EC, Joyner MJ, Wallin BG, Johnson CP, Curry TB, Eisenach JH, & Charkoudian N (2009). Age-related differences in the sympathetic-hemodynamic balance in men. *Hypertension* **54**, 127-133.
- Hatcher JD, Chiu LK, & Jennings DB (1978). Anemia as a stimulus to aortic and carotid chemoreceptors in the cat. *J Appl Physiol* **44**, 696-702.
- Hatton CJ, Carpenter E, Pepper DR, Kumar P, & Peers C (1997). Developmental changes in isolated rat type I carotid body cell K⁺ currents and their modulation by hypoxia. *J Physiol* **501** (Pt 1), 49-58.
- He L, Chen J, Dinger B, Sanders K, Sundar K, Hoidal J, & Fidone S (2002). Characteristics of carotid body chemosensitivity in NADPH oxidase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C27-C33.
- He L, Chen J, Dinger B, Sanders K, Sundar K, Hoidal J, & Fidone S (2003). Carotid body chemoreceptor activity in mice deficient in selected subunits of NADPH oxidase. *Adv Exp Med Biol* **536**, 41-46.
- He L, Chen J, Dinger B, Stensaas L, & Fidone S (2006). Effect of chronic hypoxia on purinergic synaptic transmission in rat carotid body. *J Appl Physiol* **100**, 157-162.
- He L, Dinger B, & Fidone S (2000). Cellular mechanisms involved in carotid body inhibition produced by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C845-C852.
- He L, Dinger B, & Fidone S (2005). Effect of chronic hypoxia on cholinergic chemotransmission in rat carotid body. *J Appl Physiol* **98**, 614-619.
- Headrick JP (1996). Impact of aging on adenosine levels, A₁/A₂ responses, arrhythmogenesis, and energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol* **270**, H897-H906.
- Hedenstierna G, Tokics L, Strandberg A, Lundquist H, & Brismar B (1986). Correlation of gas exchange impairment to development of atelectasis during anaesthesia and muscle paralysis. *Acta Anaesthesiol Scand* **30**, 183-191.
- Heistad DD, Abboud FM, Mark AL, & Schmid PG (1974). Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflexes. Modulation of the chemoreceptor reflex by changes in baroreceptor activity. *J Clin Invest* **53**, 1226-1236.
- Hellstrom S & Koslow SH (1975). Biogenic amines in carotid body of adult and infant rats--a gas chromatographic-mass spectrometric assay. *Acta Physiol Scand* **93**, 540-547.

Hepple RT, Hagen JL, Krause DJ, & Jackson CC (2003). Aerobic power declines with aging in rat skeletal muscles perfused at matched convective O₂ delivery. *J Appl Physiol* **94**, 744-751.

Hepple RT & Vogell JE (2004). Anatomic capillarization is maintained in relative excess of fiber oxidative capacity in some skeletal muscles of late middle-aged rats. *J Appl Physiol* **96**, 2257-2264.

Herman JK, O'Halloran KD, Janssen PL, & Bisgard GE (2003). Dopaminergic excitation of the goat carotid body is mediated by the serotonin type 3 receptor subtype. *Respir Physiol Neurobiol* **136**, 1-12.

Hess A & Zapata P (1972). Innervation of the cat carotid body: normal and experimental studies. *Fed Proc* **31**, 1365-1382.

Heymans C & Bouckaert JJ (1930). Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol* **69**, 254-266.

Hilton SM (1982). The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol* **100**, 159-174.

Hilton SM & Marshall JM (1982). The pattern of cardiovascular response to carotid chemoreceptor stimulation in the cat. *J Physiol* **326**, 495-513.

Hinschen AK, Rose'Meyer RB, & Headrick JP (2000). Age-related changes in A(1)-adenosine receptor-mediated bradycardia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H789-H795.

Hinschen AK, Rose'Meyer RB, & Headrick JP (2001). Age-related changes in adenosine-mediated relaxation of coronary and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2380-H2389.

Hobbes AF (1967). A comparison of methods of calibrating the pneumotachograph. *Br J Anaesth* **39**, 899-907.

Hof PR & Morrison JH (2004). The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci* **27**, 607-613.

Hollinshead WH (1946). The function of the abdominal chemoreceptors of the rat and mouse. *Am J Physiol* **147**, 654-660.

Horn EM & Waldrop TG (1997). Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control. *Respir Physiol* **110**, 219-228.

- Hornbein TF, Griffio ZJ, & Roos A (1961). Quantitation of chemoreceptor activity: interrelation of hypoxia and hypercapnia. *J Neurophysiol* **24**, 561-568.
- Hoshi T & Lahiri S (2004). Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Science* **306**, 2050-2051.
- Housley GD, Martin-Body RL, Dawson NJ, & Sinclair JD (1987). Brain stem projections of the glossopharyngeal nerve and its carotid sinus branch in the rat. *Neuroscience* **22**, 237-250.
- Howe A (1995). Aortic and abdominal glomera. *Adv Exp Med Biol* **381**, 57-61.
- Howe A, Pack RJ, & Wise JC (1981). Arterial chemoreceptor-like activity in the abdominal vagus of the rat. *J Physiol* **320**, 309-318.
- Hoyt RF, Jr., Feldman H, & Sorokin SP (1982). Neuroepithelial bodies (NEB) and solitary endocrine cells in the hamster lung. *Exp Lung Res* **3**, 299-311.
- Hoyt RF, Jr., McNelly NA, McDowell EM, & Sorokin SP (1991). Neuroepithelial bodies stimulate proliferation of airway epithelium in fetal hamster lung. *Am J Physiol* **260**, L234-L240.
- Hoyt RF, Jr., McNelly NA, & Sorokin SP (1990). Dynamics of neuroepithelial body (NEB) formation in developing hamster lung: light microscopic autoradiography after 3H-thymidine labeling in vivo. *Anat Rec* **227**, 340-350.
- Hoyt RF, Jr., Sorokin SP, McDowell EM, & McNelly NA (1993). Neuroepithelial bodies and growth of the airway epithelium in developing hamster lung. *Anat Rec* **236**, 15-22.
- Hsiao C, Lahiri S, & Mokashi A (1989). Peripheral and central dopamine receptors in respiratory control. *Respir Physiol* **76**, 327-336.
- Huey KA, Brown IP, Jordan MC, & Powell FL (2000). Changes in dopamine D(2)-receptor modulation of the hypoxic ventilatory response with chronic hypoxia. *Respir Physiol* **123**, 177-187.
- Huey KA & Powell FL (2000). Time-dependent changes in dopamine D(2)-receptor mRNA in the arterial chemoreflex pathway with chronic hypoxia. *Brain Res Mol Brain Res* **75**, 264-270.
- Hurst G, Heath D, & Smith P (1985). Histological changes associated with ageing of the human carotid body. *J Pathol* **147**, 181-187.

- Inoue M, Fujishiro N, & Imanaga I (1998). Hypoxia and cyanide induce depolarization and catecholamine release in dispersed guinea-pig chromaffin cells. *J Physiol* **507** (Pt 3), 807-818.
- Inoue M, Suhara T, Sudo Y, Okubo Y, Yasuno F, Kishimoto T, Yoshikawa K, & Tanada S (2001). Age-related reduction of extrastriatal dopamine D₂ receptor measured by PET. *Life Sci* **69**, 1079-1084.
- Isaacson LG & Crutcher KA (1998). Uninjured aged sympathetic neurons sprout in response to exogenous NGF in vivo. *Neurobiol Aging* **19**, 333-339.
- Iturriaga R & Alcayaga J (2004). Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Brain Res Rev* **47**, 46-53.
- Iturriaga R, Alcayaga J, & Zapata P (1988). Contribution of carotid body chemoreceptors and carotid sinus baroreceptors to the ventilatory and circulatory reflexes produced by common carotid occlusion. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* **38**, 27-48.
- Iturriaga R, Alcayaga J, & Zapata P (1996). Dissociation of hypoxia-induced chemosensory responses and catecholamine efflux in cat carotid body superfused in vitro. *J Physiol* **497** (Pt 2), 551-564.
- Iturriaga R, Lahiri S, & Mokashi A (1991). Carbonic anhydrase and chemoreception in the cat carotid body. *Am J Physiol* **261**, C565-C573.
- Iturriaga R, Larrain C, & Zapata P (1994). Phrenic nerve activity during artificial ventilation at different body temperatures and its relationships with carotid chemosensory activity. *Biol Res* **27**, 145-157.
- Iturriaga R, Mokashi A, & Lahiri S (1998). Anion exchanger and chloride channel in cat carotid body chemotransduction. *J Auton Nerv Syst* **70**, 23-31.
- Izdebska E, Jodkowski J, & Trzebski A (1982). Central influence of vasopressin on baroreceptor reflex in normotensive rats and its lack in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Experientia* **38**, 594-595.
- Jacono FJ, Peng YJ, Kumar GK, & Prabhakar NR (2005). Modulation of the hypoxic sensory response of the carotid body by 5-hydroxytryptamine: role of the 5-HT₂ receptor. *Respir Physiol Neurobiol* **145**, 135-142.
- Janczewski WA & Feldman JL (2006a). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* **570**, 407-420.

- Janczewski WA & Feldman JL (2006b). Novel data supporting the two respiratory rhythm oscillator hypothesis. Focus on "respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats". *J Neurophysiol* **96**, 1-2.
- Janssens JP, Pache JC, & Nicod LP (1999). Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* **13**, 197-205.
- Jarisch A, Landgren S, Neil E, & Zotterman Y (1952). Impulse activity in the carotid sinus nerve following intra-carotid injection of potassium chloride, veratrine, sodium citrate, adenosine-triphosphate and alpha-dinitrophenol. *Acta Physiol Scand* **25**, 195-211.
- Javaheri S & Guerra LF (1990). Effects of domperidone and medroxyprogesterone acetate on ventilation in man. *Respir Physiol* **81**, 359-370.
- Jenner TL, Mellick AS, Harrison GJ, Griffiths LR, & Rose'Meyer RB (2004). Age-related changes in cardiac adenosine receptor expression. *Mech Ageing Dev* **125**, 211-217.
- Jennings DB & Lockett HJ (2000). Angiotensin stimulates respiration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R1125-R1133.
- Jiang C & Haddad GG (1994). A direct mechanism for sensing low oxygen levels by central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7198-7201.
- Jiang C, Xu H, Cui N, & Wu J (2001). An alternative approach to the identification of respiratory central chemoreceptors in the brainstem. *Respir Physiol* **129**, 141-157.
- Jiang M, Alheid GF, Calandriello T, & McCrimmon DR (2004). Parabrachial-lateral pontine neurons link nociception and breathing. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 215-233.
- Jiang RG & Eyzaguirre C (2004). Effects of hypoxia and putative transmitters on $[Ca^{2+}]_i$ of rat glomus cells. *Brain Res* **995**, 285-296.
- Jin ZL, Lee TF, Zhou SJ, & Wang LC (1993). Age-dependent change in the inhibitory effect of an adenosine agonist on hippocampal acetylcholine release in rats. *Brain Res Bull* **30**, 149-152.
- Jodkowski JS, Coles SK, & Dick TE (1994). A 'pneumotaxic centre' in rats. *Neurosci Lett* **172**, 67-72.
- Joels N & Neil E (1962). The action of high tensions of carbon monoxide on the carotid chemoreceptors. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **139**, 528-534.
- Joels N & Neil E (1963). The excitation mechanism of the carotid body. *Br Med Bull* **19**, 21-24.

- Johansen O, Vaaler S, Jorde R, & Reikeras O (1994). Increased plasma glucose levels after Hypnorm anaesthesia, but not after Pentobarbital anaesthesia in rats. *Lab Anim* **28**, 244-248.
- Johnson RL, Jr. (1998). Low-dose dopamine and oxygen transport by the lung. *Circulation* **98**, 97-99.
- Jones JF (2004). Retrospective view of the carotid body research of Ronan G. O'Regan. *Exp Physiol* **89**, 39-43.
- Joseph JA, Berger RE, Engel BT, & Roth GS (1978). Age-related changes in the nigrostriatum: a behavioral and biochemical analysis. *J Gerontol* **33**, 643-649.
- Kaasinen V, Vilkmann H, Hietala J, Nagren K, Helenius H, Olsson H, Farde L, & Rinne J (2000). Age-related dopamine D₂/D₃ receptor loss in extrastriatal regions of the human brain. *Neurobiol Aging* **21**, 683-688.
- Kalache A & Keller I (2000). The greying world: a challenge for the twenty-first century. *Sci Prog* **83 (Pt 1)**, 33-54.
- Kara T, Narkiewicz K, & Somers VK (2003). Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand* **177**, 377-384.
- Karlsson JA (1996). The role of capsaicin-sensitive C-fibre afferent nerves in the cough reflex. *Pulm Pharmacol* **9**, 315-321.
- Kastella KG, Spurgeon HA, & Weiss GK (1974). Respiratory-related neurons in anterior hypothalamus of the cat. *Am J Physiol* **227**, 710-713.
- Kato Y, Kowalski CJ, & Stohler CS (2001). Habituation of the early pain-specific respiratory response in sustained pain. *Pain* **91**, 57-63.
- Kawai A, Ballantyne D, Muckenhoff K, & Scheid P (1996). Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* **492 (Pt 1)**, 277-292.
- Kawakami Y, Yoshikawa T, Shida A, & Asanuma Y (1981). Relationship between hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in man. *Jpn J Physiol* **31**, 357-368.
- Kazemi H & Hoop B (1991). Glutamic acid and gamma-aminobutyric acid neurotransmitters in central control of breathing. *J Appl Physiol* **70**, 1-7.
- Keating DJ, Rychkov GY, & Roberts ML (2001). Oxygen sensitivity in the sheep adrenal medulla: role of SK channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1434-C1441.

- Kebabian JW & Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**, 93-96.
- Keim WF (1964). Carotid glomectomy in bronchial asthma. *Arch Otolaryngol* **79**, 225-228.
- Kemp PJ (2005). Hemeoxygenase-2 as an O₂ sensor in K⁺ channel-dependent chemotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 648-652.
- Kemp PJ, Searle GJ, Hartness ME, Lewis A, Miller P, Williams S, Wootton P, Adriaensen D, & Peers C (2003). Acute oxygen sensing in cellular models: relevance to the physiology of pulmonary neuroepithelial and carotid bodies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **270**, 41-50.
- Kety SS (1987). Cerebral circulation and its measurement by inert diffusible tracers. *Isr J Med Sci* **23**, 3-7.
- Kholwadwala D & Donnelly DF (1992). Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. *J Physiol* **453**, 461-473.
- Kilts JD, Akazawa T, Richardson MD, & Kwatra MM (2002). Age increases cardiac Galpha(i2) expression, resulting in enhanced coupling to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **277**, 31257-31262.
- Kim C, Shvarev Y, Takeda S, Sakamoto A, Lindahl SG, & Eriksson LI (2006). Midazolam depresses carotid body chemoreceptor activity. *Acta Anaesthesiol Scand* **50**, 144-149.
- Kim DK, Prabhakar NR, & Kumar GK (2004). Acetylcholine release from the carotid body by hypoxia: evidence for the involvement of autoinhibitory receptors. *J Appl Physiol* **96**, 376-383.
- Kim I, Boyle KM, & Carroll JL (2005). Postnatal development of E-4031-sensitive potassium current in rat carotid chemoreceptor cells. *J Appl Physiol* **98**, 1469-1477.
- Kinney HC (2005). Sudden Infant Death Syndrome: increased carotid-body dopamine and noradrenaline content. *Pediatr Dev Pathol* **8**, 258-267.
- Kirby GC & McQueen DS (1986). Characterization of opioid receptors in the cat carotid body involved in chemosensory depression in vivo. *Br J Pharmacol* **88**, 889-898.
- Kitani K (2007). What really declines with age? The Hayflick Lecture for 2006 35th American Aging Association. *Age (Dordr)* **29**, 1-14.
- Kline DD, Takacs KN, Ficker E, & Kunze DL (2002). Dopamine modulates synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* **88**, 2736-2744.

Kline DD, Yang T, Premkumar DR, Thomas AJ, & Prabhakar NR (2000). Blunted respiratory responses to hypoxia in mutant mice deficient in nitric oxide synthase-3. *J Appl Physiol* **88**, 1496-1508.

Klotz U (1998). Effect of age on pharmacokinetics and pharmacodynamics in man. *Int J Clin Pharmacol Ther* **36**, 581-585.

Klotz U, Avant GR, Hoyumpa A, Schenker S, & Wilkinson GR (1975). The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *J Clin Invest* **55**, 347-359.

Kobayashi S, Conforti L, & Millhorn DE (2000). Gene expression and function of adenosine A(2A) receptor in the rat carotid body. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L273-L282.

Koerner P, Hesslinger C, Schaefermeyer A, Prinz C, & Gratzl M (2004). Evidence for histamine as a transmitter in rat carotid body sensor cells. *J Neurochem* **91**, 493-500.

Kohli JD, Glock D, & Goldberg LI (1983). Selective D_{A2} versus D_{A1} antagonist activity of domperidone in the periphery. *Eur J Pharmacol* **89**, 137-141.

Kolesnikova EE, Safronova OS, & Serebrovskaya TV (2003). Age-related peculiarities of breathing regulation and antioxidant enzymes under intermittent hypoxic training. *J Physiol Pharmacol* **54 Suppl 1**, 20-24.

Kollmeyer KR & Kleinman LI (1975). A respiratory venous chemoreceptor in the young puppy. *J Appl Physiol* **38**, 819-826.

Kondo H, Iwanaga T, & Nakajima T (1982). Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. *Cell Tissue Res* **227**, 291-295.

Kondo H & Iwasa H (1996). Re-examination of the carotid body ultrastructure with special attention to intercellular membrane appositions. *Adv Exp Med Biol* **410**, 45-50.

Koos BJ & Chau A (1998). Fetal cardiovascular and breathing responses to an adenosine A_{2a} receptor agonist in sheep. *Am J Physiol* **274**, R152-R159.

Koos BJ, Chau A, Matsuura M, Punla O, & Kruger L (1998). Thalamic locus mediates hypoxic inhibition of breathing in fetal sheep. *J Neurophysiol* **79**, 2383-2393.

Koos BJ, Maeda T, Jan C, & Lopez G (2002). Adenosine A(2A) receptors mediate hypoxic inhibition of fetal breathing in sheep. *Am J Obstet Gynecol* **186**, 663-668.

Kostyuk P, Pronchuk N, Savchenko A, & Verkhatsky A (1993). Calcium currents in aged rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* **461**, 467-483.

Kou YR, Ernsberger P, Cragg PA, Cherniack NS, & Prabhakar NR (1991). Role of alpha 2-adrenergic receptors in the carotid body response to isocapnic hypoxia. *Respir Physiol* **83**, 353-364.

Koyama Y, Coker RH, Stone EE, Lacy DB, Jabbour K, Williams PE, & Wasserman DH (2000). Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* **49**, 1434-1442.

Kreit JW & Sciurba FC (1996). The accuracy of pneumotachograph measurements during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 913-917.

Kronenberg R, Hamilton FN, Gabel R, Hickey R, Read DJ, & Severinghaus J (1972). Comparison of three methods for quantitating respiratory response to hypoxia in man. *Respir Physiol* **16**, 109-125.

Kronenberg RS & Drage CW (1973). Attenuation of the ventilatory and heart rate responses to hypoxia and hypercapnia with aging in normal men. *J Clin Invest* **52**, 1812-1819.

Krumpe PE, Knudson RJ, Parsons G, & Reiser K (1985). The aging respiratory system. *Clin Geriatr Med* **1**, 143-175.

Kumar GK, Kou YR, Overholt JL, & Prabhakar NR (2000a). Involvement of substance P in neutral endopeptidase modulation of carotid body sensory responses to hypoxia. *J Appl Physiol* **88**, 195-202.

Kumar GK & Prabhakar NR (2003). Tachykinins in the control of breathing by hypoxia: pre- and post-genomic era. *Respir Physiol Neurobiol* **135**, 145-154.

Kumar P & Bin-Jaliah I (2007). Adequate stimuli of the carotid body: more than an oxygen sensor? *Respir Physiol Neurobiol* **157**, 12-21.

Kumar P, Conway AF, Vandier C, Marshall NJ, Bruynseels J, & Matthews GM (2000b). Effect of adenosine on CO₂ chemosensitivity. Functional, cellular, and molecular studies. *Adv Exp Med Biol* **475**, 405-410.

Kvetnoy IM (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* **31**, 1-12.

Lack EE (1978). Hyperplasia of vagal and carotid body paraganglia in patients with chronic hypoxemia. *Am J Pathol* **91**, 497-516.

Lagercrantz H & Bistoletti P (1977). Catecholamine release in the newborn infant at birth. *Pediatr Res* **11**, 889-893.

Lahiri S, Buerk DG, Chugh D, Osanai S, & Mokashi A (1995). Reciprocal photolabile O₂ consumption and chemoreceptor excitation by carbon monoxide in the cat carotid body: evidence for cytochrome a₃ as the primary O₂ sensor. *Brain Res* **684**, 194-200.

Lahiri S, Buerk DG, Osanai S, Mokashi A, & Chugh DK (1997). Effect of CO on VO₂ of carotid body and chemoreception with and without Ca²⁺. *J Auton Nerv Syst* **66**, 1-6.

Lahiri S & DeLaney RG (1975). Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. *Respir Physiol* **24**, 249-266.

Lahiri S & Forster RE (2003). CO₂/H(+) sensing: peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1413-1435.

Lahiri S, Iturriaga R, Mokashi A, Ray DK, & Chugh D (1993). CO reveals dual mechanisms of O₂ chemoreception in the cat carotid body. *Respir Physiol* **94**, 227-240.

Lahiri S, Mulligan E, Nishino T, Mokashi A, & Davies RO (1981). Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to carboxyhemoglobinemia. *J Appl Physiol* **50**, 580-586.

Lahiri S, Nishino T, Mokashi A, & Mulligan E (1980). Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to hypotension. *J Appl Physiol* **48**, 781-788.

Lahiri S, Ray DK, Chugh D, Iturriaga R, & Mokashi A (1994). Co-binding chromophores in oxygen chemoreception in the carotid body. *Adv Exp Med Biol* **360**, 149-153.

Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, & Prabhakar NR (2006). Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol* **91**, 249-286.

Lahiri S, Smatresk N, Pokorski M, Barnard P, Mokashi A, & McGregor KH (1984). Dopaminergic efferent inhibition of carotid body chemoreceptors in chronically hypoxic cats. *Am J Physiol* **247**, R24-R28.

Lam SY, Fung ML, & Leung PS (2004). Regulation of the angiotensin-converting enzyme activity by a time-course hypoxia in the carotid body. *J Appl Physiol* **96**, 809-813.

Landfield PW (1987). 'Increased calcium-current' hypothesis of brain aging. *Neurobiol Aging* **8**, 346-347.

Landfield PW & Pitler TA (1984). Prolonged Ca²⁺-dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science* **226**, 1089-1092.

Landgren S & Neil E (1951). Chemoreceptor impulse activity following haemorrhage. *Acta Physiol Scand* **23**, 158-167.

Lauweryns JM & Cokelaere M (1973). Hypoxia-sensitive neuro-epithelial bodies. Intrapulmonary secretory neuroreceptors, modulated by the CNS. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **145**, 521-540.

Lauweryns JM, Cokelaere M, Deleersynder M, & Liebens M (1977). Intrapulmonary neuro-epithelial bodies in newborn rabbits. Influence of hypoxia, hyperoxia, hypercapnia, nicotine, reserpine, L-DOPA and 5-HTP. *Cell Tissue Res* **182**, 425-440.

Lauweryns JM, Cokelaere M, Lerut T, & Theunynck P (1978). Cross-circulation studies on the influence of hypoxia and hypoxaemia on neuro-epithelial bodies in young rabbits. *Cell Tissue Res* **193**, 373-386.

Lauweryns JM & Peuskens JC (1972). Neuro-epithelial bodies (neuroreceptor or secretory organs?) in human infant bronchial and bronchiolar epithelium. *Anat Rec* **172**, 471-481.

Lawson DM, Duke JL, Zammit TG, Collins HL, & DiCarlo SE (2001). Recovery from carotid artery catheterization performed under various anesthetics in male, Sprague-Dawley rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* **40**, 18-22.

Lawson W (1980). The neuroendocrine nature of the glomus cells: an experimental, ultrastructural, and histochemical tissue culture study. *Laryngoscope* **90**, 120-144.

Lee JM, Zipfel GJ, & Choi DW (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**, A7-14.

Lee KD, Mayou RA, & Torrance RW (1964). The effect of blood pressure upon chemoreceptor discharge to hypoxia, and the modification of this effect by the sympathetic-adrenal system. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* **49**, 171-183.

Legrand A, Schneider E, Gevenois PA, & De TA (2003). Respiratory effects of the scalene and sternomastoid muscles in humans. *J Appl Physiol* **94**, 1467-1472.

Leitner LM & Liaubet MJ (1971). Carotid body oxygen consumption of the cat in vitro. *Pflugers Arch* **323**, 315-322.

Leitner LM & Roumy M (1985). Effects of dopamine superfusion on the activity of rabbit carotid chemoreceptors in vitro. *Neuroscience* **16**, 431-438.

Lesser GT, Deutsch S, & Markofsky J (1973). Aging in the rat: longitudinal and cross-sectional studies of body composition. *Am J Physiol* **225**, 1472-1478.

- Leung PS, Fung ML, & Tam MS (2003). Renin-angiotensin system in the carotid body. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 847-854.
- Lewis A, Hartness ME, Chapman CG, Fearon IM, Meadows HJ, Peers C, & Kemp PJ (2001). Recombinant hTASK1 is an O(2)-sensitive K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1290-1294.
- Lewis A, Peers C, Ashford ML, & Kemp PJ (2002). Hypoxia inhibits human recombinant large conductance, Ca(2+)-activated K(+) (maxi-K) channels by a mechanism which is membrane delimited and Ca(2+) sensitive. *J Physiol* **540**, 771-780.
- Li YL, Li YF, Liu D, Cornish KG, Patel KP, Zucker IH, Channon KM, & Schultz HD (2005). Gene transfer of neuronal nitric oxide synthase to carotid body reverses enhanced chemoreceptor function in heart failure rabbits. *Circ Res* **97**, 260-267.
- Li YL, Sun SY, Overholt JL, Prabhakar NR, Rozanski GJ, Zucker IH, & Schultz HD (2004). Attenuated outward potassium currents in carotid body glomus cells of heart failure rabbit: involvement of nitric oxide. *J Physiol* **555**, 219-229.
- Lindeman RD, Tobin J, & Shock NW (1985). Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J Am Geriatr Soc* **33**, 278-285.
- Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB, Jr., & Mitchell GS (2001). Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. *J Neurosci* **21**, 5381-5388.
- Linton RA & Band DM (1985). The effect of potassium on carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. *Respir Physiol* **59**, 65-70.
- Linton RA, Lim M, Wolff CB, Wilmschurst P, & Band DM (1984). Arterial plasma potassium measured continuously during exercise in man. *Clin Sci (Lond)* **67**, 427-431.
- Lipscomb WT & Boyarsky LL (1972). Neurophysiological investigations of medullary chemosensitive areas of respiration. *Respir Physiol* **16**, 362-376.
- Llados F & Zapata P (1978). Effects of adrenoceptor stimulating and blocking agents on carotid body chemosensory inhibition. *J Physiol* **274**, 501-509.
- Loeschcke HH (1974). The apparent specificity of CO₂ as a respiratory stimulus. *Bull Physiopathol Respir (Nancy)* **10**, 857-876.
- Loeschcke HH (1982). Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* **332**, 1-24.

Lopes LV, Cunha RA, & Ribeiro JA (1999). Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A_{2A} receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats. *J Neurochem* **73**, 1733-1738.

Lopez-Barneo J (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 493-499.

Lopez-Barneo J, del TR, Levitsky KL, Chiara MD, & Ortega-Saenz P (2004). Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol* **96**, 1187-1195.

Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Urena J, & Gonzalez C (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* **241**, 580-582.

Lopez-Barneo J, Pardal R, Montoro RJ, Smani T, Garcia-Hirschfeld J, & Urena J (1999). K⁺ and Ca²⁺ channel activity and cytosolic [Ca²⁺] in oxygen-sensing tissues. *Respir Physiol* **115**, 215-227.

Lopez-Barneo J, Pardal R, & Ortega-Saenz P (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* **63**, 259-287.

Lopez-Lopez J, Gonzalez C, Urena J, & Lopez-Barneo J (1989). Low pO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* **93**, 1001-1015.

Lopez-Lopez JR & Gonzalez C (1992). Time course of K⁺ current inhibition by low oxygen in chemoreceptor cells of adult rabbit carotid body. Effects of carbon monoxide. *FEBS Lett* **299**, 251-254.

Lowe P, Heath D, & Smith P (1987a). Relation between histological age-changes in the carotid body and atherosclerosis in the carotid arteries. *J Laryngol Otol* **101**, 1271-1275.

Lowe P, Heath D, & Smith P (1987b). Relation between histological age-changes in the carotid body and atherosclerosis in the carotid arteries. *J Laryngol Otol* **101**, 1271-1275.

Loyola H, Fadic R, Cardenas H, Larrain C, & Zapata P (1991). Effects of body temperature on chemosensory activity of the cat carotid body in situ. *Neurosci Lett* **132**, 251-254.

Lundberg JM, Hokfelt T, Fahrenkrug J, Nilsson G, & Terenius L (1979). Peptides in the cat carotid body (glomus caroticum): VIP-, enkephalin-, and substance P-like immunoreactivity. *Acta Physiol Scand* **107**, 279-281.

Luo Y & Roth GS (2000). The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* **2**, 449-460.

- Lytton WW (1998). Adapting a feedforward heteroassociative network to Hodgkin-Huxley dynamics. *J Comput Neurosci* **5**, 353-364.
- Ma A, Bravo M, & Kappagoda CT (2003). Responses of bronchial C-fiber afferents of the rabbit to changes in lung compliance. *Respir Physiol Neurobiol* **138**, 155-163.
- Maass-Moreno R & Katona PG (1989). Species dependence of baroreceptor effects on ventilation in the cat and the dog. *J Appl Physiol* **67**, 2116-2124.
- MacLennan WJ, Hall MR, & Timothy JI (1980). Postural hypotension in old age: is it a disorder of the nervous system or of blood vessels? *Age Ageing* **9**, 25-32.
- Macri MA, D'Alessandro N, Di GC, Di IP, Di LS, Giuliani P, Esposito E, & Pokorski M (2010). Region-specific effects on brain metabolites of hypoxia and hyperoxia overlaid on cerebral ischemia in young and old rats: a quantitative proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Biomed Sci* **17**, 14.
- Maines MD (2000). The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **46**, 573-585.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, & Nicoll RA (1989). The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* **12**, 444-450.
- Mancia M, Margnelli M, Mariotti M, Spreafico R, & Broggi G (1974). Brain stem-thalamus reciprocal influences in the cat. *Brain Res* **69**, 297-314.
- Marder E (1998). From biophysics to models of network function. *Annu Rev Neurosci* **21**, 25-45.
- Marek W, Muckenhoff K, & Prabhakar NR (2008). Significance of pulmonary vagal afferents for respiratory muscle activity in the cat. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 6**, 407-420.
- Marshall JM (1987). Analysis of cardiovascular responses evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J Physiol* **394**, 393-414.
- Marshall JM (1994). Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev* **74**, 543-594.
- Marshall JM & Metcalfe JD (1988). Cardiovascular changes associated with augmented breaths in normoxia and hypoxia in the rat. *J Physiol* **400**, 15-27.

- Martin-Body RL, Robson GJ, & Sinclair JD (1985). Respiratory effects of sectioning the carotid sinus glossopharyngeal and abdominal vagal nerves in the awake rat. *J Physiol* **361**, 35-45.
- Matsuoka T, Saiki C, & Mortola JP (1994). Metabolic and ventilatory responses to anemic hypoxia in conscious rats. *J Appl Physiol* **77**, 1067-1072.
- Mayer CA, Haxhiu MA, Martin RJ, & Wilson CG (2006). Adenosine A_{2A} receptors mediate GABAergic inhibition of respiration in immature rats. *J Appl Physiol* **100**, 91-97.
- McBride B & Whitelaw WA (1981). A physiological stimulus to upper airway receptors in humans. *J Appl Physiol* **51**, 1189-1197.
- McCloskey DI & Mitchell JH (1972). Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol* **224**, 173-186.
- McDonald DM (1983). A morphometric analysis of blood vessels and perivascular nerves in the rat carotid body. *J Neurocytol* **12**, 155-199.
- McDonald DM & Larue DT (1983). The ultrastructure and connections of blood vessels supplying the rat carotid body and carotid sinus. *J Neurocytol* **12**, 117-153.
- McLean AJ & Le Couteur DG (2004). Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* **56**, 163-184.
- McQueen DS (1980). Effects of substance P on carotid chemoreceptor activity in the cat. *J Physiol* **302**, 31-47.
- McQueen DS, Bond SM, Moores C, Chessell I, Humphrey PP, & Dowd E (1998). Activation of P2X receptors for adenosine triphosphate evokes cardiorespiratory reflexes in anaesthetized rats. *J Physiol* **507** (Pt 3), 843-855.
- McQueen DS, Dashwood MR, Cobb VJ, Bond SM, Marr CG, & Spyer KM (1995). Endothelins and rat carotid body: autoradiographic and functional pharmacological studies. *J Auton Nerv Syst* **53**, 115-125.
- McQueen DS, Dashwood MR, Cobb VJ, & Marr CG (1994). Effects of endothelins on respiration and arterial chemoreceptor activity in anaesthetised rats. *Adv Exp Med Biol* **360**, 289-291.
- McQueen DS & Eyzaguirre C (1974). Effects of temperature on carotid chemoreceptor and baroreceptor activity. *J Neurophysiol* **37**, 1287-1296.

- McQueen DS & Ribeiro JA (1981a). Effects of beta-endorphin, vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin octapeptide on cat carotid chemoreceptor activity. *Q J Exp Physiol* **66**, 273-284.
- McQueen DS & Ribeiro JA (1981b). Effect of adenosine on carotid chemoreceptor activity in the cat. *Br J Pharmacol* **74**, 129-136.
- McQueen DS & Ribeiro JA (1983). On the specificity and type of receptor involved in carotid body chemoreceptor activation by adenosine in the cat. *Br J Pharmacol* **80**, 347-354.
- McQueen DS & Ribeiro JA (1986). Pharmacological characterization of the receptor involved in chemoexcitation induced by adenosine. *Br J Pharmacol* **88**, 615-620.
- McQueen DS & Ungar A (1971). On the direct and crossed components of reflex responses to unilateral stimulation of the carotid body chemoreceptors in the dog. *J Physiol* **219**, 1-16.
- Medi C, Kalman JM, & Freedman SB (2009). Supraventricular tachycardia. *Med J Aust* **190**, 255-260.
- Memo M, Lucchi L, Spano PF, & Trabucchi M (1980). Aging process affects a single class of dopamine receptors. *Brain Res* **202**, 488-492.
- Mercuro G, Rossetti ZL, Rivano CA, Ruscazio M, Tocco L, Gessa G, & Cherchi A (1987). Peripheral dopamine receptors in the antihypertensive action of dihydroergotoxine in humans. *Hypertension* **9**, 35-40.
- Mesco ER, Carlson SG, Joseph JA, & Roth GS (1993). Decreased striatal D₂ dopamine receptor mRNA synthesis during aging. *Brain Res Mol Brain Res* **17**, 160-162.
- Michaelis LL & Gilmore JP (1969). Renal effects of electrical stimulation of the carotid sinus nerve. *Surgery* **65**, 797-801.
- Michelakis ED, Archer SL, & Weir EK (1995). Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: a model of oxygen sensing. *Physiol Res* **44**, 361-367.
- Michelakis ED, Hampl V, Nsair A, Wu X, Harry G, Haromy A, Gurtu R, & Archer SL (2002). Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res* **90**, 1307-1315.
- Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, & Archer SL (2004). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 1119-1136.

- Millhorn DE, Eldridge FL, & Waldrop TG (1981). Pharmacologic study of respiratory afterdischarge. *J Appl Physiol* **50**, 239-244.
- Mills E & Jobsis FF (1972). Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor response to changes in oxygen tension. *J Neurophysiol* **35**, 405-428.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, & Johnson JE, Jr. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* **15**, 575-591.
- Mir AK, McQueen DS, Pallot DJ, & Nahorski SR (1984). Direct biochemical and neuropharmacological identification of dopamine D₂-receptors in the rabbit carotid body. *Brain Res* **291**, 273-283.
- Mir AK, Pallot DJ, & Nahorski SR (1983). Biogenic amine-stimulated cyclic adenosine-3',5'-monophosphate formation in the rat carotid body. *J Neurochem* **41**, 663-669.
- Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA, Bavis RW, Mack KJ, & Olson EB, Jr. (2001). Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol* **90**, 2466-2475.
- Mitchell GS & Johnson SM (2003). Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* **94**, 358-374.
- Modis K, Gero D, Nagy N, Szoleczky P, Toth ZD, & Szabo C (2009). Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis. *Br J Pharmacol* **158**, 1565-1578.
- Mokashi A, Li J, Roy A, Baby SM, & Lahiri S (2003). ATP causes glomus cell [Ca²⁺]_i increase without corresponding increases in CSN activity. *Respir Physiol Neurobiol* **138**, 1-18.
- Monopoli A, Casati C, Lozza G, Forlani A, & Ongini E (1998). Cardiovascular pharmacology of the A_{2A} adenosine receptor antagonist, SCH 58261, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **285**, 9-15.
- Montandon G, Kinkead R, & Bairam A (2007). Disruption of adenosinergic modulation of ventilation at rest and during hypercapnia by neonatal caffeine in young rats: role of adenosine A(1) and A(2A) receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1621-R1631.
- Monteiro EC & Ribeiro JA (1991). Adenosine and the bradycardiac response to vagus nerve stimulation in rats. *Eur J Pharmacol* **204**, 193-202.
- Monteiro EC & Ribeiro JA (2000). Adenosine-dopamine interactions and ventilation mediated through carotid body chemoreceptors. *Adv Exp Med Biol* **475**, 671-684.

Monteiro EC & Ribeiro JA (1987). Ventilatory effects of adenosine mediated by carotid body chemoreceptors in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **335**, 143-148.

Monteiro EC & Ribeiro JA (1989). Inhibition by 1,3-dipropyl-8(p-sulfophenyl)xanthine of the respiratory stimulation induced by common carotid occlusion in rats. *Life Sci* **45**, 939-945.

Monteiro EC, Vera-Cruz P, Monteiro TC, & Silva e Sousa MA (1996). Adenosine increases the cAMP content of the rat carotid body in vitro. *Adv Exp Med Biol* **410**, 299-303.

Monti-Bloch L & Eyzaguirre C (1985). Effects of methionine-enkephalin and substance P on the chemosensory discharge of the cat carotid body. *Brain Res* **338**, 297-307.

Moore-Ede MC (1986). Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol* **250**, R737-R752.

Morelli M, Mennini T, Cagnotto A, Toffano G, & Di CG (1990). Quantitative autoradiographical analysis of the age-related modulation of central dopamine D₁ and D₂ receptors. *Neuroscience* **36**, 403-410.

Morrison JH (2001). Which synapses are affected in aging and what is the nature of their vulnerability? A commentary on "life span and synapses: will there be a primary senile dementia?". *Neurobiol Aging* **22**, 349-350.

Morrison JH & Hof PR (1997). Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**, 412-419.

Mortola JP & Frappell PB (2000). Ventilatory responses to changes in temperature in mammals and other vertebrates. *Annu Rev Physiol* **62**, 847-874.

Mortola JP & Saiki C (1996). Ventilatory response to hypoxia in rats: gender differences. *Respir Physiol* **106**, 21-34.

Moudgil R, Michelakis ED, & Archer SL (2005). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* **98**, 390-403.

Mudumbi RV, Olson RD, Hubler BE, Montamat SC, & Vestal RE (1995). Age-related effects in rabbit hearts of N6-R-phenylisopropyladenosine, an adenosine A₁ receptor agonist. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50**, B351-B357.

Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, & Guyenet PG (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* **7**, 1360-1369.

- Mulligan E & Lahiri S (1982). Separation of carotid body chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ by oligomycin and by antimycin A. *Am J Physiol* **242**, C200-C206.
- Mulligan E, Lahiri S, & Storey BT (1981). Carotid body O₂ chemoreception and mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol* **51**, 438-446.
- Munoz-Cabello AM, Toledo-Aral JJ, Lopez-Barneo J, & Echevarria M (2005). Rat adrenal chromaffin cells are neonatal CO₂ sensors. *J Neurosci* **25**, 6631-6640.
- Murchison D & Griffith WH (1996). High-voltage-activated calcium currents in basal forebrain neurons during aging. *J Neurophysiol* **76**, 158-174.
- Murchison D & Griffith WH (1998). Increased calcium buffering in basal forebrain neurons during aging. *J Neurophysiol* **80**, 350-364.
- Murchison D, Zawieja DC, & Griffith WH (2004). Reduced mitochondrial buffering of voltage-gated calcium influx in aged rat basal forebrain neurons. *Cell Calcium* **36**, 61-75.
- Nagase T, Fukuchi Y, Teramoto S, Matsuse T, & Orimo H (1994). Mechanical interdependence in relation to age: effects of lung volume on airway resistance in rats. *J Appl Physiol* **77**, 1172-1177.
- Nair PK, Buerk DG, & Whalen WJ (1986). Cat carotid body oxygen metabolism and chemoreception described by a two-cytochrome model. *Am J Physiol* **250**, H202-H207.
- Nakano H, Lee SD, & Farkas GA (2002). Dopaminergic modulation of ventilation in obese Zucker rats. *J Appl Physiol* **92**, 25-32.
- Nakayama K (1961). Surgical removal of the carotid body for bronchial asthma. *Dis Chest* **40**, 595-604.
- Narkiewicz K, van de Borne PJ, Montano N, Dyken ME, Phillips BG, & Somers VK (1998). Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* **97**, 943-945.
- Nassar N & bdel-Rahman AA (2006). Central adenosine signaling plays a key role in centrally mediated hypotension in conscious aortic barodenervated rats. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 255-261.
- Nattie E (1999). CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* **59**, 299-331.
- Nattie EE (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol* **129**, 257-268.

- Nattie EE, Gdovin M, & Li A (1993). Retrotrapezoid nucleus glutamate receptors: control of CO₂-sensitive phrenic and sympathetic output. *J Appl Physiol* **74**, 2958-2968.
- Nattie EE & Li AH (1990). Ventral medulla sites of muscarinic receptor subtypes involved in cardiorespiratory control. *J Appl Physiol* **69**, 33-41.
- Nattie EE, Li AH, & St John WM (1991). Lesions in retrotrapezoid nucleus decrease ventilatory output in anesthetized or decerebrate cats. *J Appl Physiol* **71**, 1364-1375.
- Nattie EE & Prabhakar NR (2001). Peripheral and central chemosensitivity: multiple mechanisms, multiple sites? A workshop summary. *Adv Exp Med Biol* **499**, 73-80.
- Neil E (1973a). A reappraisal of the role of the carotid body in respiration. *Bull Physiopathol Respir (Nancy)* **9**, 587-592.
- Neil E (1973b). An appraisal of the work of Corneille Heymans on baroreceptor and chemoreceptor reflexes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* Suppl-93.
- Neil E & O'Regan RG (1971a). Efferent and afferent impulse activity recorded from few-fibre preparations of otherwise intact sinus and aortic nerves. *J Physiol* **215**, 33-47.
- Neil E & O'Regan RG (1971b). The effects of electrical stimulation of the distal end of the cut sinus and aortic nerves on peripheral arterial chemoreceptor activity in the cat. *J Physiol* **215**, 15-32.
- Neubauer JA (2004). Comroe's study of aortic chemoreceptors: a path well chosen. *J Appl Physiol* **97**, 1595-1596.
- Neubauer JA & Sunderram J (2004). Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol* **96**, 367-374.
- Newby FD, DiGirolamo M, Cotsonis GA, & Kutner MH (1990). Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol* **259**, R1117-R1125.
- Nicholls DG (2004). Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* **3**, 35-40.
- Nielsen M & Smith H (1952). Studies on the regulation of respiration in acute hypoxia; with a appendix on respiratory control during prolonged hypoxia. *Acta Physiol Scand* **24**, 293-313.
- Nishijima K, Tsubone H, & Atoji Y (2004). Contribution of free nerve endings in the laryngeal epithelium to CO₂ reception in rats. *Auton Neurosci* **110**, 81-88.

Nishino T, Isono S, Tanaka A, & Ishikawa T (2004). Laryngeal inputs in defensive airway reflexes in humans. *Pulm Pharmacol Ther* **17**, 377-381.

Nishino T & Lahiri S (1981). Effects of dopamine on chemoreflexes in breathing. *J Appl Physiol* **50**, 892-897.

Noble D (2008). Claude Bernard, the first systems biologist, and the future of physiology. *Exp Physiol* **93**, 16-26.

Nunes AR, Batuca JR, & Monteiro EC (2010). Acute hypoxia modifies cAMP levels induced by inhibitors of phosphodiesterase-4 in rat carotid bodies, carotid arteries and superior cervical ganglia. *Br J Pharmacol* **159**, 353-361.

Nurse CA (2005). Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Auton Neurosci* **120**, 1-9.

Nurse CA (1987). Localization of acetylcholinesterase in dissociated cell cultures of the carotid body of the rat. *Cell Tissue Res* **250**, 21-27.

Nurse CA (1990). Carbonic anhydrase and neuronal enzymes in cultured glomus cells of the carotid body of the rat. *Cell Tissue Res* **261**, 65-71.

Nurse CA & Zhang M (1999). Acetylcholine contributes to hypoxic chemotransmission in co-cultures of rat type 1 cells and petrosal neurons. *Respir Physiol* **115**, 189-199.

O'Halloran KD, Janssen PL, & Bisgard GE (1998). Dopaminergic modulation of respiratory motor output in peripherally chemodenervated goats. *J Appl Physiol* **85**, 946-954.

O'Regan RG (1979). Oxygen usage of the cat carotid body perfused with cell-free solutions. *Ir J Med Sci* **148**, 69-77.

O'Regan RG (1981). Responses of carotid body chemosensory activity and blood flow to stimulation of sympathetic nerves in the cat. *J Physiol* **315**, 81-98.

Obeso A, Almaraz L, & Gonzalez C (1985). Correlation between adenosine triphosphate levels, dopamine release and electrical activity in the carotid body: support for the metabolic hypothesis of chemoreception. *Brain Res* **348**, 64-68.

Obeso A, Almaraz L, & Gonzalez C (1986). Effects of 2-deoxy-D-glucose on in vitro cat carotid body. *Brain Res* **371**, 25-36.

Obeso A, Almaraz L, & Gonzalez C (1989a). Effects of cyanide and uncouplers on chemoreceptor activity and ATP content of the cat carotid body. *Brain Res* **481**, 250-257.

- Obeso A, Gomez-Nino A, & Gonzalez C (1999). NADPH oxidase inhibition does not interfere with low PO₂ transduction in rat and rabbit CB chemoreceptor cells. *Am J Physiol* **276**, C593-C601.
- Obeso A, Gonzalez C, Dinger B, & Fidone S (1989b). Metabolic activation of carotid body glomus cells by hypoxia. *J Appl Physiol* **67**, 484-487.
- Obeso A, Gonzalez C, Rigual R, Dinger B, & Fidone S (1993). Effect of low O₂ on glucose uptake in rabbit carotid body. *J Appl Physiol* **74**, 2387-2393.
- Obeso A, Rocher A, Fidone S, & Gonzalez C (1992). The role of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels in stimulus-evoked catecholamine release from chemoreceptor cells of the carotid body. *Neuroscience* **47**, 463-472.
- Oeppen J & Vaupel JW (2002). Demography. Broken limits to life expectancy. *Science* **296**, 1029-1031.
- Ohtake PJ & Jennings DB (1992). Ventilation is stimulated by small reductions in arterial pressure in the awake dog. *J Appl Physiol* **73**, 1549-1557.
- Okada Y, Chen Z, & Kuwana S (2001). Cytoarchitecture of central chemoreceptors in the mammalian ventral medulla. *Respir Physiol* **129**, 13-23.
- Ongini E, Dionisotti S, Gessi S, Irenius E, & Fredholm BB (1999). Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **359**, 7-10.
- Onimaru H, Arata A, & Homma I (1989). Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro. *Exp Brain Res* **76**, 530-536.
- Onimaru H & Homma I (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* **23**, 1478-1486.
- Oomori Y, Ishikawa K, Satoh Y, & Ono K (1995). Electron-microscopic study of gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in the chief cells of the mouse carotid body. *Acta Anat (Basel)* **154**, 143-146.
- Oomori Y, Nakaya K, Tanaka H, Iuchi H, Ishikawa K, Satoh Y, & Ono K (1994). Immunohistochemical and histochemical evidence for the presence of noradrenaline, serotonin and gamma-aminobutyric acid in chief cells of the mouse carotid body. *Cell Tissue Res* **278**, 249-254.
- Orlando MM & Panuska JA (1972). Dimethylsulfoxide and thermoregulation: studies on body temperature, metabolic rate and thyroid function. *Cryobiology* **9**, 198-204.

- Ortega-Saenz P, Pardal R, Garcia-Fernandez M, & Lopez-Barneo J (2003). Rotenone selectively occludes sensitivity to hypoxia in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* **548**, 789-800.
- Oruc T & Terzioglu M (1979). The sensitivity to hypoxia of peripheral and central respiratory control mechanisms under normo- and hypothermic conditions. *Bull Eur Physiopathol Respir* **15**, 1117-1128.
- Osanai S, Buerk DG, Mokashi A, Chugh DK, & Lahiri S (1997). Cat carotid body chemosensory discharge (in vitro) is insensitive to charybdotoxin. *Brain Res* **747**, 324-327.
- Osanai S, Takahashi T, Nakano H, Ohsaki Y, & Kikuchi K (2003). Effect of HERG-like potassium channel blocker on the carotid body chemoreception. *Adv Exp Med Biol* **536**, 117-122.
- Ou LC & Tenney SM (1979). Adrenocortical function in rats chronically exposed to high altitude. *J Appl Physiol* **47**, 1185-1187.
- Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, & Prabhakar NR (2000a). HERG-Like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotid body. *J Neurophysiol* **83**, 1150-1157.
- Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, & Prabhakar NR (2000b). Chemosensing at the carotid body. Involvement of a HERG-like potassium current in glomus cells. *Adv Exp Med Biol* **475**, 241-248.
- Overholt JL & Prabhakar NR (1997). Ca^{2+} current in rabbit carotid body glomus cells is conducted by multiple types of high-voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Neurophysiol* **78**, 2467-2474.
- Overholt JL & Prabhakar NR (1999). Norepinephrine inhibits a toxin resistant Ca^{2+} current in carotid body glomus cells: evidence for a direct G protein mechanism. *J Neurophysiol* **81**, 225-233.
- Paintal AS (1971). The responses of chemoreceptors at reduced temperatures. *J Physiol* **217**, 1-18.
- Paintal AS (1969). Mechanism of stimulation of type J pulmonary receptors. *J Physiol* **203**, 511-532.
- Paintal AS (1995). Some recent advances in studies on J receptors. *Adv Exp Med Biol* **381**, 15-25.

- Paintal AS & Anand A (1992). Factors affecting movement of excitatory substances from pulmonary capillaries to type J receptors of anaesthetized cats. *J Physiol* **449**, 155-168.
- Pan J, Yeger H, & Cutz E (2004). Innervation of pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in developing rabbit lung. *J Histochem Cytochem* **52**, 379-389.
- Panisello JM & Donnelly DF (1998). Chemotransduction by carotid body chemoreceptors is dependent on bicarbonate currents. *Respir Physiol* **112**, 265-281.
- Pardal R & Lopez-Barneo J (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* **5**, 197-198.
- Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Platero-Luengo A, & Lopez-Barneo J (2010). The carotid body, a neurogenic niche in the adult peripheral nervous system. *Arch Ital Biol* **148**, 95-105.
- Parfitt KD, Gratton A, & Bickford-Wimer PC (1990). Electrophysiological effects of selective D₁ and D₂ dopamine receptor agonists in the medial prefrontal cortex of young and aged Fischer 344 rats. *J Pharmacol Exp Ther* **254**, 539-545.
- Paterson DJ (1992). Potassium and ventilation in exercise. *J Appl Physiol* **72**, 811-820.
- Paterson DJ, Dorrington KL, Bergel DH, Kerr G, Miall RC, Stein JF, & Nye PC (1992). Effect of potassium on ventilation in the rhesus monkey. *Exp Physiol* **77**, 217-220.
- Paterson DJ, Estavillo JA, & Nye PC (1988). The effect of hypoxia on plasma potassium concentration and the excitation of arterial chemoreceptors in the cat. *Q J Exp Physiol* **73**, 623-625.
- Paterson DJ & Nye PC (1988). The effect of beta adrenergic blockade on the carotid body response to hyperkalaemia in the cat. *Respir Physiol* **74**, 229-237.
- Paterson DJ, Robbins PA, & Conway J (1989). Changes in arterial plasma potassium and ventilation during exercise in man. *Respir Physiol* **78**, 323-330.
- Patil CK, Mian IS, & Campisi J (2005). The thorny path linking cellular senescence to organismal aging. *Mech Ageing Dev* **126**, 1040-1045.
- Pearse AG, Polak JM, Rost FW, Fontaine J, Le LC, & Le DN (1973). Demonstration of the neural crest origin of type I (APUD) cells in the avian carotid body, using a cytochemical marker system. *Histochemie* **34**, 191-203.
- Peers C (2004). Interactions of chemostimuli at the single cell level: studies in a model system. *Exp Physiol* **89**, 60-65.

- Peers C (1990a). Effect of lowered extracellular pH on Ca^{2+} -dependent K^+ currents in type I cells from the neonatal rat carotid body. *J Physiol* **422**, 381-395.
- Peers C (1990b). Hypoxic suppression of K^+ currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca^{2+} -activated K^+ current. *Neurosci Lett* **119**, 253-256.
- Peers C (1997). Oxygen-sensitive ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 405-408.
- Peers C & Buckler KJ (1995). Transduction of chemostimuli by the type I carotid body cell. *J Membr Biol* **144**, 1-9.
- Peers C & Green FK (1991). Inhibition of Ca^{2+} -activated K^+ currents by intracellular acidosis in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *J Physiol* **437**, 589-602.
- Pepper DR, Landauer RC, & Kumar P (1995). Postnatal development of CO_2 - O_2 interaction in the rat carotid body in vitro. *J Physiol* **485 (Pt 2)**, 531-541.
- Perez-Garcia MT, Almaraz L, & Gonzalez C (1990). Effects of different types of stimulation on cyclic AMP content in the rabbit carotid body: functional significance. *J Neurochem* **55**, 1287-1293.
- Perez-Garcia MT, Almaraz L, & Gonzalez C (1991). Cyclic AMP modulates differentially the release of dopamine induced by hypoxia and other stimuli and increases dopamine synthesis in the rabbit carotid body. *J Neurochem* **57**, 1992-2000.
- Perez-Garcia MT, Colinas O, Miguel-Velado E, Moreno-Dominguez A, & Lopez-Lopez JR (2004). Characterization of the Kv channels of mouse carotid body chemoreceptor cells and their role in oxygen sensing. *J Physiol* **557**, 457-471.
- Perrin DG, Chan W, Cutz E, Madapallimattam A, & Sole MJ (1986). Serotonin in the human infant carotid body. *Experientia* **42**, 562-564.
- Perrin DG, Cutz E, Becker LE, Bryan AC, Madapallimattam A, & Sole MJ (1984). Sudden infant death syndrome: increased carotid-body dopamine and noradrenaline content. *Lancet* **2**, 535-537.
- Persichini T, Mazzone V, Polticelli F, Moreno S, Venturini G, Clementi E, & Colasanti M (2005). Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neurosci Lett* **384**, 254-259.
- Perucca E (2007). Age-related changes in pharmacokinetics: predictability and assessment methods. *Int Rev Neurobiol* **81**, 183-199.

- Peterson DD, Pack AI, Silage DA, & Fishman AP (1981). Effects of aging on ventilatory and occlusion pressure responses to hypoxia and hypercapnia. *Am Rev Respir Dis* **124**, 387-391.
- Petheo GL, Molnar Z, Roka A, Makara JK, & Spat A (2001). A pH-sensitive chloride current in the chemoreceptor cell of rat carotid body. *J Physiol* **535**, 95-106.
- Phillipson EA & Kozar LF (1993). Effect of aging on metabolic respiratory control in sleeping dogs. *Am Rev Respir Dis* **147**, 1521-1525.
- Pierrefiche O, Foutz AS, Champagnat J, & avit-Saubie M (1994). NMDA and non-NMDA receptors may play distinct roles in timing mechanisms and transmission in the feline respiratory network. *J Physiol* **474**, 509-523.
- Pierrefiche O, Haji A, Foutz AS, Takeda R, Champagnat J, & avit-Saubie M (1998). Synaptic potentials in respiratory neurones during evoked phase switching after NMDA receptor blockade in the cat. *J Physiol* **508 (Pt 2)**, 549-559.
- Pineda J & Aghajanian GK (1997). Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* **77**, 723-743.
- Pitler TA & Landfield PW (1990). Aging-related prolongation of calcium spike duration in rat hippocampal slice neurons. *Brain Res* **508**, 1-6.
- Pokorski M & Antosiewicz J (2010). Alterations in the hypoxic ventilatory response with advancing age in awake rats. *J Physiol Pharmacol* **61**, 227-232.
- Pokorski M & Lahiri S (1983). Aortic and carotid chemoreceptor responses to metabolic acidosis in the cat. *Am J Physiol* **244**, R652-R658.
- Pokorski M & Marczak M (2003). Ventilatory response to hypoxia in elderly women. *Ann Hum Biol* **30**, 53-64.
- Pokorski M, Walski M, Dymecka A, & Marczak M (2004). The aging carotid body. *J Physiol Pharmacol* **55 Suppl 3**, 107-113.
- Popoli P, Betto P, Rimondini R, Reggio R, Pezzola A, Ricciarello G, Fuxe K, & Ferre S (1998). Age-related alteration of the adenosine/dopamine balance in the rat striatum 100. *Brain Res* **795**, 297-300.
- Porter NM, Thibault O, Thibault V, Chen KC, & Landfield PW (1997). Calcium channel density and hippocampal cell death with age in long-term culture. *J Neurosci* **17**, 5629-5639.

- Porzionato A, Macchi V, Guidolin D, Parenti A, Ferrara SD, & De CR (2005). Histopathology of carotid body in heroin addiction. Possible chemosensitive impairment. *Histopathology* **46**, 296-306.
- Porzionato A, Macchi V, Sandra BA, Parenti A, & De CR (2006). Adrenomedullin immunoreactivity in the human carotid body. *Peptides* **27**, 69-73.
- Post JM, Gelband CH, & Hume JR (1995). $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res* **77**, 131-139.
- Post JM, Hume JR, Archer SL, & Weir EK (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* **262**, C882-C890.
- Pottorf WJ, Duckles SP, & Buchholz JN (2002). Aging and calcium buffering in adrenergic neurons. *Auton Neurosci* **96**, 2-7.
- Poulin MJ, Cunningham DA, Paterson DH, Kowalchuk JM, & Smith WD (1993). Ventilatory sensitivity to CO_2 in hyperoxia and hypoxia in older aged humans. *J Appl Physiol* **75**, 2209-2216.
- Prabhakar NR (2000). Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol* **88**, 2287-2295.
- Prabhakar NR (1998). Endogenous carbon monoxide in control of respiration. *Respir Physiol* **114**, 57-64.
- Prabhakar NR (1999). NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol* **115**, 161-168.
- Prabhakar NR (2006). O_2 sensing at the mammalian carotid body: why multiple O_2 sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* **91**, 17-23.
- Prabhakar NR (2001). Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* **90**, 1986-1994.
- Prabhakar NR, Dinerman JL, Agani FH, & Snyder SH (1995a). Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1994-1997.
- Prabhakar NR, Gouda E, Kumar GK, & Kou YR (1995b). Analysis of carotid chemoreceptor responses to substance P analogue in anaesthetized cats. *J Auton Nerv Syst* **52**, 43-50.

- Prabhakar NR & Jacono FJ (2005). Cellular and molecular mechanisms associated with carotid body adaptations to chronic hypoxia. *High Alt Med Biol* **6**, 112-120.
- Prabhakar NR, Kumar GK, Chang CH, Agani FH, & Haxhiu MA (1993). Nitric oxide in the sensory function of the carotid body. *Brain Res* **625**, 16-22.
- Preston ME, Jensen D, Janssen I, & Fisher JT (2009). Effect of menopause on the chemical control of breathing and its relationship with acid-base status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R722-R727.
- Purves MJ (1970). The effect of hypoxia, hypercapnia and hypotension upon carotid body blood flow and oxygen consumption in the cat. *J Physiol* **209**, 395-416.
- Putnam RW, Filosa JA, & Ritucci NA (2004). Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1493-C1526.
- Rafael H (2004). Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* **54**, 1035-1036.
- Raff H & Fagin KD (1984). Measurement of hormones and blood gases during hypoxia in conscious cannulated rats. *J Appl Physiol* **56**, 1426-1430.
- Raff H, Shinsako J, Keil LC, & Dallman MF (1983). Vasopressin, ACTH, and corticosteroids during hypercapnia and graded hypoxia in dogs. *Am J Physiol* **244**, E453-E458.
- Raper AJ, Thompson WT, Jr., Shapiro W, & Patterson JL, Jr. (1966). Scalene and sternomastoid muscle function. *J Appl Physiol* **21**, 497-502.
- Rebola N, Sebastiao AM, de MA, Oliveira CR, Ribeiro JA, & Cunha RA (2003). Enhanced adenosine A_{2A} receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *J Neurophysiol* **90**, 1295-1303.
- Reddy MK, Patel KP, & Schultz HD (2005). Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R789-R797.
- Redline S & Strohl KP (1987). Influence of upper airway sensory receptors on respiratory muscle activation in humans. *J Appl Physiol* **63**, 368-374.
- Rey S & Iturriaga R (2004). Endothelins and nitric oxide: vasoactive modulators of carotid body chemoreception. *Curr Neurovasc Res* **1**, 465-473.

- Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, & Stripp BR (2000). Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* **156**, 269-278.
- Riccardi A, Arboscello E, Ghinatti M, Minuto P, & Lerza R (2008). Adenosine in the treatment of supraventricular tachycardia: 5 years of experience (2002-2006). *Am J Emerg Med* **26**, 879-882.
- Richerson GB (2004). Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci* **5**, 449-461.
- Richerson GB, Wang W, Hodges MR, Dohle CI, & ez-Sampedro A (2005). Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. *Exp Physiol* **90**, 259-266.
- Richter DW, Ballanyi K, & Schwarzscher S (1992). Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 788-793.
- Richter DW & Spyer KM (2001). Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci* **24**, 464-472.
- Rico AJ, Prieto-Lloret J, Donnelly DF, De FC, Gonzalez C, & Rigual R (2003). The use of NK-1 receptor null mice to assess the significance of substance P in the carotid body function. *Adv Exp Med Biol* **536**, 327-336.
- Rico AJ, Prieto-Lloret J, Gonzalez C, & Rigual R (2005). Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an in vitro study. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1417-C1425.
- Ridderstrale Y & Hanson MA (1984). Histochemical localization of carbonic anhydrase in the cat carotid body. *Ann N Y Acad Sci* **429**, 398-400.
- Riesco-Fagundo AM, Perez-Garcia MT, Gonzalez C, & Lopez-Lopez JR (2001). O(2) modulates large-conductance Ca(2+)-dependent K(+) channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO-sensitive mechanism. *Circ Res* **89**, 430-436.
- Rigual R, Gonzalez E, Fidone S, & Gonzalez C (1984). Effects of low pH on synthesis and release of catecholamines in the cat carotid body in vitro. *Brain Res* **309**, 178-181.
- Rigual R, Gonzalez E, Gonzalez C, & Fidone S (1986). Synthesis and release of catecholamines by the cat carotid body in vitro: effects of hypoxic stimulation. *Brain Res* **374**, 101-109.
- Rigual R, Iniguez C, Carreres J, & Gonzalez C (1985). Carbonic anhydrase in the carotid body and the carotid sinus nerve. *Histochemistry* **82**, 577-580.

- Rigual R, Lopez-Lopez JR, & Gonzalez C (1991). Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high PCO₂ stimulation of the cat carotid body. *J Physiol* **433**, 519-531.
- Rigual R, Rico AJ, Prieto-Lloret J, De FC, Gonzalez C, & Donnelly DF (2002). Chemoreceptor activity is normal in mice lacking the NK1 receptor. *Eur J Neurosci* **16**, 2078-2084.
- Rocher A, Geijo-Barrientos E, Caceres AI, Rigual R, Gonzalez C, & Almaraz L (2005). Role of voltage-dependent calcium channels in stimulus-secretion coupling in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol* **562**, 407-420.
- Rocher A, Gonzalez C, & Almaraz L (1999). Adenosine inhibits L-type Ca²⁺ current and catecholamine release in the rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Eur J Neurosci* **11**, 673-681.
- Rocher A, Obeso A, Cachero MT, Herreros B, & Gonzalez C (1994a). Participation of Na⁺ channels in the response of carotid body chemoreceptor cells to hypoxia. *Am J Physiol* **267**, C738-C744.
- Rocher A, Obeso A, Gonzalez C, & Herreros B (1991). Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *J Physiol* **433**, 533-548.
- Rocher A, Obeso A, Herreros B, & Gonzalez C (1988). Activation of the release of dopamine in the carotid body by veratridine. Evidence for the presence of voltage-dependent Na⁺ channels in type I cells. *Neurosci Lett* **94**, 274-278.
- Rocher A, Obeso A, Herreros B, & Gonzalez C (1994b). Assessment of Na⁺ channel involvement in the release of catecholamines from chemoreceptor cells of the carotid body. *Adv Exp Med Biol* **360**, 201-204.
- Rodeheffer RJ, Gerstenblith G, Becker LC, Fleg JL, Weisfeldt ML, & Lakatta EG (1984). Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation* **69**, 203-213.
- Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, & Burnstock G (2003). Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* **23**, 11315-11321.
- Rose'Meyer RB, Mellick AS, Garnham BG, Harrison GJ, Massa HM, & Griffiths LR (2003). The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Res Brain Res Protoc* **11**, 9-18.
- Roth GS & Joseph JA (1994a). Cellular and molecular mechanisms of impaired dopaminergic function during aging. *Ann N Y Acad Sci* **719**, 129-135.

- Roth GS & Joseph JA (1994b). Age-related changes in transcriptional and posttranscriptional regulation of the dopaminergic system. *Life Sci* **55**, 2031-2035.
- Roy A, Rozanov C, Iturriaga R, Mokashi A, & Lahiri S (1997). Acid-sensing by carotid body is inhibited by blockers of voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *Brain Res* **769**, 396-399.
- Roy A, Rozanov C, Mokashi A, Daudu P, Al-mehdi AB, Shams H, & Lahiri S (2000a). Mice lacking in gp91 phox subunit of NAD(P)H oxidase showed glomus cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and respiratory responses to hypoxia. *Brain Res* **872**, 188-193.
- Roy A, Rozanov C, Mokashi A, & Lahiri S (2000b). $\text{P}(\text{O}_2)$ - $\text{P}(\text{CO}_2)$ stimulus interaction in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and CSN activity in the adult rat carotid body. *Respir Physiol* **122**, 15-26.
- Rubin PC, Scott PJ, McLean K, Pearson A, Ross D, & Reid JL (1982). Atenolol disposition in young and elderly subjects. *Br J Clin Pharmacol* **13**, 235-237.
- Rubin PC, Scott PJ, & Reid JL (1981). Prazosin disposition in young and elderly subjects. *Br J Clin Pharmacol* **12**, 401-404.
- Rumsey WL, Iturriaga R, Spergel D, Lahiri S, & Wilson DF (1991). Optical measurements of the dependence of chemoreception on oxygen pressure in the cat carotid body. *Am J Physiol* **261**, C614-C622.
- Runold M, Cherniack NS, & Prabhakar NR (1990). Effect of adenosine on isolated and superfused cat carotid body activity. *Neurosci Lett* **113**, 111-114.
- Sage MD, West EJ, & Gavin JB (1985). Cardiac performance of isolated beating hearts obtained from rats anesthetized by three different agents. *Lab Anim Sci* **35**, 153-155.
- Saldiva PH, Caldeira MP, & Zin WA (1988). Respiratory mechanics in the aging rat. *Braz J Med Biol Res* **21**, 863-868.
- Sampson SR (1972). Mechanism of efferent inhibition of carotid body chemoreceptors in the cat. *Brain Res* **45**, 266-270.
- Samuels ER, Hou RH, Langley RW, Szabadi E, & Bradshaw CM (2007). Comparison of pramipexole with and without domperidone co-administration on alertness, autonomic, and endocrine functions in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **64**, 591-602.
- Sanchez D, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT, Sanz-Alfayate G, Obeso A, Ganfornina MD, & Gonzalez C (2002). Molecular identification of K α subunits that contribute to the oxygen-sensitive K^+ current of chemoreceptor cells of the rabbit carotid body. *J Physiol* **542**, 369-382.

- Sanders KA, Sundar KM, He L, Dinger B, Fidone S, & Hoidal JR (2002). Role of components of the phagocytic NADPH oxidase in oxygen sensing. *J Appl Physiol* **93**, 1357-1364.
- Sant'Ambrogio G, Tsubone H, & Sant'Ambrogio FB (1995). Sensory information from the upper airway: role in the control of breathing. *Respir Physiol* **102**, 1-16.
- Santer RM & Owen RG (1986). Arterial supply of the rat superior cervical ganglion: a morphological and semiquantitative histochemical investigation. *J Anat* **147**, 107-114.
- Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, & Cowan WM (1976). Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* **117**, 305-312.
- Sapru HN & Krieger AJ (1977). Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *J Appl Physiol* **42**, 344-348.
- Sato M, Ikeda K, Yoshizaki K, & Koyano H (1991). Response of cytosolic calcium to anoxia and cyanide in cultured glomus cells of newborn rabbit carotid body. *Brain Res* **551**, 327-330.
- Saywell SA & Feldman JL (2004). Dynamic interactions of excitatory and inhibitory inputs in hypoglossal motoneurons: respiratory phasing and modulation by PKA. *J Physiol* **554**, 879-889.
- Schiffmann SN & Vanderhaeghen JJ (1993). Age-related loss of mRNA encoding adenosine A₂ receptor in the rat striatum. *Neurosci Lett* **158**, 121-124.
- Schlenker EH & Goldman M (1985). Ventilatory responses of aged male and female rats to hypercapnia and to hypoxia. *Gerontology* **31**, 301-308.
- Schulkin J (2003). Allostasis: a neural behavioral perspective. *Horm Behav* **43**, 21-27.
- Schwarzacher SW, Wilhelm Z, Anders K, & Richter DW (1991). The medullary respiratory network in the rat. *J Physiol* **435**, 631-644.
- Schwenke DO & Cragg PA (2004). Comparison of the depressive effects of four anesthetic regimens on ventilatory and cardiovascular variables in the guinea pig. *Comp Med* **54**, 77-85.
- Scislo TJ, Kitchen AM, Augustyniak RA, & O'Leary DS (2001). Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 120-124.

Scott PJ & Reid JL (1982). The effect of age on the responses of human isolated arteries to noradrenaline. *Br J Clin Pharmacol* **13**, 237-239.

Sebastiao AM, Cunha RA, de MA, & Ribeiro JA (2000a). Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br J Pharmacol* **131**, 1629-1634.

Sebastiao AM, Cunha RA, de MA, & Ribeiro JA (2000b). Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br J Pharmacol* **131**, 1629-1634.

Seidler FJ & Slotkin TA (1985). Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* **358**, 1-16.

Semenza GL (1999). Perspectives on oxygen sensing. *Cell* **98**, 281-284.

Serebrovskaya T, Karaban I, Mankovskaya I, Bernardi L, Passino C, & Appenzeller O (1998). Hypoxic ventilatory responses and gas exchange in patients with Parkinson's disease. *Respiration* **65**, 28-33.

Severson CA, Wang W, Pieribone VA, Dohle CI, & Richerson GB (2003). Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. *Nat Neurosci* **6**, 1139-1140.

Shams H (1985). Differential effects of CO₂ and H⁺ as central stimuli of respiration in the cat. *J Appl Physiol* **58**, 357-364.

Shang L, Ananthakrishnan R, Li Q, Quadri N, Abdillahi M, Zhu Z, Qu W, Rosario R, Toure F, Yan SF, Schmidt AM, & Ramasamy R (2010). RAGE modulates hypoxia/reoxygenation injury in adult murine cardiomyocytes via JNK and GSK-3beta signaling pathways. *PLoS One* **5**, e10092.

Shannon R, Bolser DC, & Lindsey BG (1987). Medullary expiratory activity: influence of intercostal tendon organs and muscle spindle endings. *J Appl Physiol* **62**, 1057-1062.

Shaw K, Montague W, & Pallot DJ (1989). Biochemical studies on the release of catecholamines from the rat carotid body in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1013**, 42-46.

Shen L & Duffin J (2002). Caudal expiratory neurones in the rat. *Pflugers Arch* **444**, 405-410.

Shi X, Gallagher KM, Welch-O'Connor RM, & Foresman BH (1996). Arterial and cardiopulmonary baroreflexes in 60- to 69- vs. 18- to 36-yr-old humans. *J Appl Physiol* **80**, 1903-1910.

- Shirahata M, Andronikou S, & Lahiri S (1987). Differential effects of oligomycin on carotid chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ in the cat. *J Appl Physiol* **63**, 2084-2092.
- Shirahata M & Sham JS (1999). Roles of ion channels in carotid body chemotransmission of acute hypoxia. *Jpn J Physiol* **49**, 213-228.
- Silveira SA, Viana Lima NR, Haibara AS, & Coimbra CC (2003). The hypothalamic paraventricular nucleus and carotid receptors modulate hyperglycemia induced by hemorrhage. *Brain Res* **993**, 183-191.
- Sisson S, Grossman JD, & Getty R (1975). *Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals*, 5th ed ed. Saunders, Philadelphia.
- Slamowitz D, Chen L, & Scharf SM (1999). Effects of vagotomy on cardiovascular response to periodic apneas in sedated pigs. *J Appl Physiol* **86**, 1890-1896.
- Smith JC, Butera RJ, Koshiya N, Del NC, Wilson CG, & Johnson SM (2000). Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respir Physiol* **122**, 131-147.
- Smith JC, Greer JJ, Liu GS, & Feldman JL (1990). Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J Neurophysiol* **64**, 1149-1169.
- Smith SA & Fasler JJ (1983). Age-related changes in autonomic function: relationship with postural hypotension. *Age Ageing* **12**, 206-210.
- Smith WD, Poulin MJ, Paterson DH, & Cunningham DA (2001). Dynamic ventilatory response to acute isocapnic hypoxia in septuagenarians. *Exp Physiol* **86**, 117-126.
- Sneyd JR, Linton RA, & Band DM (1988). Ventilatory effects of potassium during hyperoxia, normoxia and hypoxia in anaesthetized cats. *Respir Physiol* **72**, 59-64.
- Snyder DL, Wang W, Pelleg A, Friedman E, Horwitz J, & Roberts J (1998). Effect of aging on A₁-adenosine receptor-mediated inhibition of norepinephrine release in the rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**, 352-358.
- Snyder SH (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* **257**, 494-496.
- Sohal RS & Weindruch R (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging 5. *Science* **273**, 59-63.

Solomon IC, Edelman NH, & Neubauer JA (2000). Pre-Botzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* **83**, 2854-2868.

Solomon IC, Halat TJ, El-Maghrabi MR, & O'Neal MH, III (2001). Localization of connexin26 and connexin32 in putative CO(2)-chemosensitive brainstem regions in rat. *Respir Physiol* **129**, 101-121.

Somers VK, Mark AL, & Abboud FM (1991). Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *J Clin Invest* **87**, 1953-1957.

Somers VK, Mark AL, Zavala DC, & Abboud FM (1989). Influence of ventilation and hypocapnia on sympathetic nerve responses to hypoxia in normal humans. *J Appl Physiol* **67**, 2095-2100.

Soulage C, Pequignot JM, & Perrin D (2004). Breathing pattern and hypoxic sensitivity during ageing in a new model of obesity-resistant rat. *Respir Physiol Neurobiol* **144**, 45-57.

Spergel D & Lahiri S (1993). Differential modulation by extracellular ATP of carotid chemosensory responses. *J Appl Physiol* **74**, 3052-3056.

Spyer KM, Dale N, & Gourine AV (2004). ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp Physiol* **89**, 53-59.

Spyer KM, McQueen DS, Dashwood MR, Sykes RM, Daly MB, & Muddle JR (1991). Localization of [125I]endothelin binding sites in the region of the carotid bifurcation and brainstem of the cat: possible baro- and chemoreceptor involvement. *J Cardiovasc Pharmacol* **17 Suppl 7**, S385-S389.

Starlinger H & Lubbers DW (1976). Oxygen consumption of the isolated carotid body tissue (cat). *Pflugers Arch* **366**, 61-66.

Stea A & Nurse CA (1989). Chloride channels in cultured glomus cells of the rat carotid body. *Am J Physiol* **257**, C174-C181.

Stea A & Nurse CA (1991). Contrasting effects of HEPES vs HCO₃(-)-buffered media on whole-cell currents in cultured chemoreceptors of the rat carotid body. *Neurosci Lett* **132**, 239-242.

Stornetta RL, Seigny CP, & Guyenet PG (2003). Inspiratory augmenting bulbospinal neurons express both glutamatergic and enkephalinergic phenotypes. *J Comp Neurol* **455**, 113-124.

- Streller T, Huckstorf C, Pfeiffer C, & Acker H (2002). Unusual cytochrome a592 with low PO₂ affinity correlates as putative oxygen sensor with rat carotid body chemoreceptor discharge. *FASEB J* **16**, 1277-1279.
- Strohl KP & Thomas AJ (2001). Ventilatory behavior and metabolism in two strains of obese rats. *Respir Physiol* **124**, 85-93.
- Sullivan CE (1980). Bilateral carotid body resection in asthma: vulnerability to hypoxic death in sleep. *Chest* **78**, 354.
- Summers BA, Overholt JL, & Prabhakar NR (2002). CO₂ and pH independently modulate L-type Ca²⁺ current in rabbit carotid body glomus cells. *J Neurophysiol* **88**, 604-612.
- Summers BA, Overholt JL, & Prabhakar NR (2000). Augmentation of L-type calcium current by hypoxia in rabbit carotid body glomus cells: evidence for a PKC-sensitive pathway. *J Neurophysiol* **84**, 1636-1644.
- Summers BA, Overholt JL, & Prabhakar NR (1999). Nitric oxide inhibits L-type Ca²⁺ current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism. *J Neurophysiol* **81**, 1449-1457.
- Sun MK & Reis DJ (1994). Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol* **266**, R245-R256.
- Sun SY, Wang W, Zucker IH, & Schultz HD (1999b). Enhanced peripheral chemoreflex function in conscious rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol* **86**, 1264-1272.
- Sun SY, Wang W, Zucker IH, & Schultz HD (1999a). Enhanced activity of carotid body chemoreceptors in rabbits with heart failure: role of nitric oxide. *J Appl Physiol* **86**, 1273-1282.
- Suzuki M, Nishina M, Nakamura S, & Maruyama K (2004). Benzodiazepine-sensitive GABA(A) receptors in the commissural subnucleus of the NTS are involved in the carotid chemoreceptor reflex in rats. *Auton Neurosci* **110**, 108-113.
- Tankersley CG, Elston RC, & Schnell AH (2000). Genetic determinants of acute hypoxic ventilation: patterns of inheritance in mice. *J Appl Physiol* **88**, 2310-2318.
- Tatar M, Hanacek J, & Widdicombe J (2008). The expiration reflex from the trachea and bronchi. *Eur Respir J* **31**, 385-390.
- Tatsumi K, Pickett CK, & Weil JV (1995). Possible role of dopamine in ventilatory acclimatization to high altitude. *Respir Physiol* **99**, 63-73.

- Taveira da Silva AM, Hartley B, Hamosh P, Quest JA, & Gillis RA (1987). Respiratory depressant effects of GABA alpha- and beta-receptor agonists in the cat. *J Appl Physiol* **62**, 2264-2272.
- Taylor AA, Fennell WH, Feldman MB, Brandon TA, Ginos JZ, & Mitchell JR (1983). Activation of peripheral dopamine presynaptic receptors lowers blood pressure and heart rate in dogs. *Hypertension* **5**, 226-234.
- Taylor NC, Li A, & Nattie EE (2005). Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *J Physiol* **566**, 543-557.
- Tenney SM & Bartlett D, Jr. (1967). Comparative quantitative morphology of the mammalian lung: trachea. *Respir Physiol* **3**, 130-135.
- Terry RD & Katzman R (2001). Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol Aging* **22**, 347-348.
- Thibault O, Hadley R, & Landfield PW (2001). Elevated postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity. *J Neurosci* **21**, 9744-9756.
- Thomas T & Spyer KM (2000). ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception. *J Physiol* **523 Pt 2**, 441-447.
- Thompson RJ, Farragher SM, Cutz E, & Nurse CA (2002). Developmental regulation of O(2) sensing in neonatal adrenal chromaffin cells from wild-type and NADPH-oxidase-deficient mice. *Pflugers Arch* **444**, 539-548.
- Thompson RJ & Nurse CA (1998). Anoxia differentially modulates multiple K⁺ currents and depolarizes neonatal rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **512 (Pt 2)**, 421-434.
- Timmers HJ, Karemaker JM, Wieling W, Marres HA, & Lenders JW (2003a). Baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity after carotid body tumor resection. *Hypertension* **42**, 143-149.
- Timmers HJ, Wieling W, Karemaker JM, & Lenders JW (2003b). Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol* **553**, 3-11.
- Tipton MJ, Golden FS, Higenbottam C, Mekjavic IB, & Eglin CM (1998). Temperature dependence of habituation of the initial responses to cold-water immersion. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **78**, 253-257.
- Tjong YW, Chen Y, Liong EC, Ip SF, Tipoe GL, & Fung ML (2004). Melatonin attenuates rat carotid chemoreceptor response to hypercapnic acidosis. *J Pineal Res* **36**, 49-57.

- Tjong YW, Chen Y, Liong EC, Tipoe GL, & Fung ML (2006). Chronic hypoxia modulates the function and expression of melatonin receptors in the rat carotid body. *J Pineal Res* **40**, 125-134.
- Toescu EC (2005). Normal brain ageing: models and mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2347-2354.
- Toescu EC & Verkhatsky A (2000). Parameters of calcium homeostasis in normal neuronal ageing. *J Anat* **197 Pt 4**, 563-569.
- Toescu EC, Verkhatsky A, & Landfield PW (2004). Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* **27**, 614-620.
- Toledo-Aral JJ, Mendez-Ferrer S, Pardal R, Echevarria M, & Lopez-Barneo J (2003). Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* **23**, 141-148.
- Troen BR (2003). The biology of aging. *Mt Sinai J Med* **70**, 3-22.
- Trzebski A, Sato Y, Suzuki A, & Sato A (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates the responsiveness of carotid chemoreceptors to systemic hypoxia in the rat. *Neurosci Lett* **190**, 29-32.
- Tsubone H (1986). Characteristics of vagal afferent activity in rats: three types of pulmonary receptors responding to collapse, inflation, and deflation of the lung. *Exp Neurol* **92**, 541-552.
- Tumer N, Sego RL, & Scarpace PJ (1996). Atypical pattern of adenylyl cyclase activity in the adrenal medulla with age. *Exp Gerontol* **31**, 571-576.
- Turner DL, Bach KB, Martin PA, Olsen EB, Brownfield M, Foley KT, & Mitchell GS (1997). Modulation of ventilatory control during exercise. *Respir Physiol* **110**, 277-285.
- Turner JM, Mead J, & Wohl ME (1968). Elasticity of human lungs in relation to age. *J Appl Physiol* **25**, 664-671.
- Turnheim K (2003). When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp Gerontol* **38**, 843-853.
- Urena J, Fernandez-Chacon R, Benot AR, varez de Toledo GA, & Lopez-Barneo J (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10208-10211.

- Valdes V, Mosqueira M, Rey S, Del RR, & Iturriaga R (2003). Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution of neural and endothelial nitric oxide synthase isoforms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L57-L68.
- van de BP, Oren R, & Somers VK (1998). Dopamine depresses minute ventilation in patients with heart failure. *Circulation* **98**, 126-131.
- van den Aardweg JG & Karemaker JM (1992). Repetitive apneas induce periodic hypertension in normal subjects through hypoxia. *J Appl Physiol* **72**, 821-827.
- Van LA (2001). Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatr Respir Rev* **2**, 171-176.
- Vandier C, Conway AF, Landauer RC, & Kumar P (1999). Presynaptic action of adenosine on a 4-aminopyridine-sensitive current in the rat carotid body. *J Physiol* **515 (Pt 2)**, 419-429.
- Varas R, Alcayaga J, & Iturriaga R (2003). ACh and ATP mediate excitatory transmission in cat carotid identified chemoreceptor units in vitro. *Brain Res* **988**, 154-163.
- Vardhan A, Kachroo A, & Sapru HN (1993). Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am J Physiol* **264**, R41-R50.
- Varez-Buylla R & de Alvarez-Buylla ER (1988). Carotid sinus receptors participate in glucose homeostasis. *Respir Physiol* **72**, 347-359.
- Varez-Buylla R & de Alvarez-Buylla ER (1994). Changes in blood glucose concentration in the carotid body modify brain glucose retention. *Adv Exp Med Biol* **360**, 293-296.
- Varez-Buylla R, Huberman A, Montero S, & de Alvarez-Buylla ER (1996). Functional activation of cerebral glucose uptake after carotid body stimulation. *Adv Exp Med Biol* **410**, 411-420.
- Varez-Buylla R, Huberman A, Montero S, Lemus M, Valles V, & de Alvarez-Buylla ER (2003). Induction of brain glucose uptake by a factor secreted into cerebrospinal fluid. *Brain Res* **994**, 124-133.
- Vaupel JW, Carey JR, Christensen K, Johnson TE, Yashin AI, Holm NV, Iachine IA, Kannisto V, Khazaeli AA, Liedo P, Longo VD, Zeng Y, Manton KG, & Curtsinger JW (1998). Biodemographic trajectories of longevity. *Science* **280**, 855-860.
- Vega-Saenz de ME & Rudy B (1992). Modulation of K⁺ channels by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1681-1687.

- Verna A, Talib N, Roumy M, & Pradet A (1990). Effects of metabolic inhibitors and hypoxia on the ATP, ADP and AMP content of the rabbit carotid body in vitro: the metabolic hypothesis in question. *Neurosci Lett* **116**, 156-161.
- Vibert JF, Caille D, Bertrand F, Gromysz H, & Hugelin A (1979). Ascending projection from the respiratory centre to mesencephalon and diencephalon. *Neurosci Lett* **11**, 29-33.
- Vicario I, Rigual R, Obeso A, & Gonzalez C (2000). Characterization of the synthesis and release of catecholamine in the rat carotid body in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C490-C499.
- Vincent SG, Waddell AE, Caron MG, Walker JK, & Fisher JT (2007). A murine model of hyperdopaminergic state displays altered respiratory control. *FASEB J* **21**, 1463-1471.
- Vovk A, Smith WD, Paterson ND, Cunningham DA, & Paterson DH (2004). Peripheral chemoreceptor control of ventilation following sustained hypoxia in young and older adult humans. *Exp Physiol* **89**, 647-656.
- Wach RA, Bee D, & Barer GR (1989). Dopamine and ventilatory effects of hypoxia and almitrine in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* **67**, 186-192.
- Wallace DR & Booze RM (1996). Dopamine D₃ receptor density elevation in aged Fischer-344 x Brown-Norway (F1) rats. *Eur J Pharmacol* **308**, 283-285.
- Wallin BG & Fagius J (1988). Peripheral sympathetic neural activity in conscious humans. *Annu Rev Physiol* **50**, 565-576.
- Wang W & Richerson GB (1999). Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. *Neuroscience* **90**, 1001-1011.
- Wang W, Tiwari JK, Bradley SR, Zaykin RV, & Richerson GB (2001). Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. *J Neurophysiol* **85**, 2224-2235.
- Wang WJ, Cheng GF, Dinger BG, & Fidone SJ (1989). Effects of hypoxia on cyclic nucleotide formation in rabbit carotid body in vitro. *Neurosci Lett* **105**, 164-168.
- Wang ZZ, Brecht DS, Fidone SJ, & Stensaas LJ (1993). Neurons synthesizing nitric oxide innervate the mammalian carotid body. *J Comp Neurol* **336**, 419-432.
- Wang ZZ, He L, Stensaas LJ, Dinger BG, & Fidone SJ (1991). Localization and in vitro actions of atrial natriuretic peptide in the cat carotid body. *J Appl Physiol* **70**, 942-946.

Wang ZZ, Stensaas LJ, Bredt DS, Dinger B, & Fidone SJ (1994). Localization and actions of nitric oxide in the cat carotid body. *Neuroscience* **60**, 275-286.

Wang ZZ, Stensaas LJ, Dinger B, & Fidone SJ (1992). The co-existence of biogenic amines and neuropeptides in the type I cells of the cat carotid body. *Neuroscience* **47**, 473-480.

Ward JP (2003). Mitochondria and oxygen sensing: fueling the controversy. *J Physiol* **548**, 664.

Washburn CP, Sirois JE, Talley EM, Guyenet PG, & Bayliss DA (2002). Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *J Neurosci* **22**, 1256-1265.

Wasicko MJ, Sterni LM, Bamford OS, Montrose MH, & Carroll JL (1999). Resetting and postnatal maturation of oxygen chemosensitivity in rat carotid chemoreceptor cells. *J Physiol* **514** (Pt 2), 493-503.

Waypa GB, Chandel NS, & Schumacker PT (2001). Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* **88**, 1259-1266.

Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, & Schumacker PT (2002). Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* **91**, 719-726.

Waypa GB & Schumacker PT (2005). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* **98**, 404-414.

Wei JY, Mendelowitz D, Anastasi N, & Rowe JW (1986). Maintenance of carotid baroreflex function in advanced age in the rat. *Am J Physiol* **250**, R1047-R1051.

Weil JV, Byrne-Quinn E, Sodal IE, Filley GF, & Grover RF (1971). Acquired attenuation of chemoreceptor function in chronically hypoxic man at high altitude. *J Clin Invest* **50**, 186-195.

Weindruch R & Walford RL (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* **215**, 1415-1418.

Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, & Archer SL (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* **353**, 2042-2055.

Welsh MJ, Heistad DD, & Abboud FM (1978). Depression of ventilation by dopamine in man. Evidence for an effect on the chemoreceptor reflex. *J Clin Invest* **61**, 708-713.

- Wenninger JM, Olson EB, Jr., Cotter CJ, Thomas CF, & Behan M (2009). Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *J Appl Physiol* **106**, 1522-1528.
- Whalen WJ & Nair P (1975). Some factors affecting tissue PO₂ in the carotid body. *J Appl Physiol* **39**, 562-566.
- Whalen WJ & Nair P (1976). PO₂ in the carotid body perfused and/or superfused with cell-free media. *J Appl Physiol* **41**, 180-184.
- Whalen WJ, Nair P, Sidebotham T, Spande J, & Lacerna M (1981). Cat carotid body: oxygen consumption and other parameters. *J Appl Physiol* **50**, 129-133.
- Whipp BJ & Wasserman K (1980). Carotid bodies and ventilatory control dynamics in man. *Fed Proc* **39**, 2668-2673.
- Widdicombe J (1998). Upper airway reflexes. *Curr Opin Pulm Med* **4**, 376-382.
- Widdicombe JG (1992). Chemoreceptor control of the airways. *Respir Physiol* **87**, 373-381.
- Wiemann M & Bingmann D (2001). Ventrolateral neurons of medullary organotypic cultures: intracellular pH regulation and bioelectric activity. *Respir Physiol* **129**, 57-70.
- Wiernsperger N, Danzeisen M, & Meier-Ruge W (1978). Effect of carotid ligation on cerebral tissue oxygenation in aging rat. *Gerontology* **24**, 321-325.
- Willems L, Ashton KJ, & Headrick JP (2005). Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovasc Res* **66**, 245-255.
- Williams BA, Smyth J, Boon AW, Hanson MA, Kumar P, & Blanco CE (1991). Development of respiratory chemoreflexes in response to alternations of fractional inspired oxygen in the newborn infant. *J Physiol* **442**, 81-90.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, & Kemp PJ (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* **306**, 2093-2097.
- Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A, & Evans AM (2001). Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem* **276**, 11180-11188.

- Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, & Marshall WK (1987). A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. *Lab Anim Sci* **37**, 726-730.
- Wuytack F, Raeymaekers L, & Missiaen L (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* **32**, 279-305.
- Wyatt CN & Buckler KJ (2004). The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J Physiol* **556**, 175-191.
- Wyatt CN & Peers C (1994). Ca(2+)-activated K(+)-channels from isolated type I carotid body cells of the neonatal rat. *Adv Exp Med Biol* **360**, 159-161.
- Wyatt CN, Weir EK, & Peers C (1994). Diphenylene iodonium blocks K⁺ and Ca²⁺ currents in type I cells isolated from the neonatal rat carotid body. *Neurosci Lett* **172**, 63-66.
- Wyatt CN, Wright C, Bee D, & Peers C (1995). O₂-sensitive K⁺ currents in carotid body chemoreceptor cells from normoxic and chronically hypoxic rats and their roles in hypoxic chemotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 295-299.
- Wynne HA, Cope LH, Herd B, Rawlins MD, James OF, & Woodhouse KW (1990). The association of age and frailty with paracetamol conjugation in man. *Age Ageing* **19**, 419-424.
- Xiong J, Camello PJ, Verkhratsky A, & Toescu EC (2004). Mitochondrial polarisation status and [Ca²⁺]_i signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro. *Neurobiol Aging* **25**, 349-359.
- Xiong J, Verkhratsky A, & Toescu EC (2002). Changes in mitochondrial status associated with altered Ca²⁺ homeostasis in aged cerebellar granule neurons in brain slices. *J Neurosci* **22**, 10761-10771.
- Xu F, Xu J, Tse FW, & Tse A (2006). Adenosine stimulates depolarization and rise in cytoplasmic [Ca²⁺]_i in type I cells of rat carotid bodies. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1592-C1598.
- Xu J, Tse FW, & Tse A (2003). ATP triggers intracellular Ca²⁺ release in type II cells of the rat carotid body. *J Physiol* **549**, 739-747.
- Yamazaki H, Okazaki M, Takeda R, & Haji A (2002). Hypercapnic and hypoxic ventilatory responses in long-term streptozotocin-diabetic rats during conscious and pentobarbital-induced anesthetic states. *Life Sci* **72**, 79-89.

- Young IM (1957). Some observations on the mechanism of adrenaline hyperpnoea. *J Physiol* **137**, 374-395.
- Youngson C, Nurse C, Yeger H, & Cutz E (1993). Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* **365**, 153-155.
- Yu BP, Masoro EJ, & McMahan CA (1985). Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol* **40**, 657-670.
- Yu G, Fournier C, Hess DC, & Borlongan CV (2005). Transplantation of carotid body cells in the treatment of neurological disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 803-810.
- Zapata P (1975). Effects of dopamine on carotid chemo- and baroreceptors in vitro. *J Physiol* **244**, 235-251.
- Zapata P (1977). Modulatory role of dopamine on arterial chemoreceptors. *Adv Biochem Psychopharmacol* **16**, 291-298.
- Zapata P, Larrain C, Iturriaga R, & Alcayaga J (1994). The carotid bodies as thermosensors: experiments in vitro and in situ, and importance for ventilatory regulation. *Adv Exp Med Biol* **360**, 253-255.
- Zapata P & Torrealba F (1984). Blockade of dopamine-induced chemosensory inhibition by domperidone. *Neurosci Lett* **51**, 359-364.
- Zapata P & Zuazo A (1980). Respiratory effects of dopamine-induced inhibition of chemosensory inflow. *Respir Physiol* **40**, 79-92.
- Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, & Jose PA (2007). The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci (Lond)* **112**, 583-597.
- Zhang L, Qu Y, Yang C, Tang J, Zhang X, Mao M, Mu D, & Ferriero D (2009). Signaling pathway involved in hypoxia-inducible factor-1alpha regulation in hypoxic-ischemic cortical neurons in vitro. *Neurosci Lett* **461**, 1-6.
- Zhang M, Fearon IM, Zhong H, & Nurse CA (2003). Presynaptic modulation of rat arterial chemoreceptor function by 5-HT: role of K⁺ channel inhibition via protein kinase C. *J Physiol* **551**, 825-842.
- Zhang M & Nurse CA (2004). CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh. *J Neurophysiol* **92**, 3433-3445.

Zhang M & Nurse CA (2000). Does endogenous 5-HT mediate spontaneous rhythmic activity in chemoreceptor clusters of rat carotid body? *Brain Res* **872**, 199-203.

Zietkiewicz E, Wojda A, & Witt M (2009). Cytogenetic perspective of ageing and longevity in men and women. *J Appl Genet* **50**, 261-273.

Zocchi C, Ongini E, Conti A, Monopoli A, Negretti A, Baraldi PG, & Dionisotti S (1996a). The non-xanthine heterocyclic compound SCH 58261 is a new potent and selective A_{2A} adenosine receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 398-404.

Zocchi C, Ongini E, Ferrara S, Baraldi PG, & Dionisotti S (1996b). Binding of the radioligand [3H]-SCH 58261, a new non-xanthine A_{2A} adenosine receptor antagonist, to rat striatal membranes. *Br J Pharmacol* **117**, 1381-1386.